Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Der Stoffwechsel des Nikethamid bei der Ratte und seine Beeinflußbarkeit durch Isomere des Hexachlorcyclohexan

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dietlind Roedler

aus Berlin

1967

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Der Stoffwechsel des Nikethamid bei der Ratte und seine Beeinflußbarkeit durch Isomere des Hexachlorcyclohexan

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dietlind Roedler

aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med.Alfred N.Witt

Referent: Professor Dr.med.Wolfgang Koransky

Korreferent: Professor Dr.med.Hans Herken

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 11. Mai 1967

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 1

Methoden 3

Substanzen 3 - Dünnschichtchromatographie 6 - Messung der Radioaktivität 7 - Isotopenverdünnungsmethode 9 - Autoradiographie 9 - Bestimmung der Schmelzpunkte 10 - Registrierung der UV-Spektren 10 - Tierversuche zum Nikethamid-Stoffwechsel in vitro 10, in vivo 16

Ergebnisse 17

A Untersuchung des Nikethamid-Stoffwechsels in vitro ... 17

Identifizierung der Bande 1 18 - Die Bande 5 18 - Nicotinsäureamid und Nicotinsäuremonoäthylamid 20 - Die Freisetzung von Acetaldehyd während der Desäthylierung von Nikethamid 24 - Die Desäthylierung von Nikethamid durch Lebermikrosomen HCH-vergifteter Tiere 27 - Gewöhnung an Nikethamid 27 - Die Desäthylierung von Nicotinsäuremonoäthylamid 28 - Versuche mit Hirnhomogenaten 29 - Identifizierung der Bande 3 als Nikethamid-N-oxyd 30 - Bande 6 35

B Nikethamid-Abbau in vivo 36

Bestimmung der Abbauprodukte des Nikethamid bei unvorbehandelten, mit α-HCH und Nikethamid vorbehandelten Tieren 36 - Bestimmung der Nikethamid-Konzentration in Leber, Blut, Gehirn zum Zeitpunkt des Auftretens von Krämpfen bei unvorbehandelten Tieren und nach Vorbehandlung mit α-HCH 46 - Bestimmung der spezif. Aktivität der verwendeten ^{3}H-Nikethamid-Lösung 47 - Bestimmung der applizierten Radioaktivität 47 - Nikethamid-Zusatz zur Isotopenverdünnung 49 - Bestimmung der Aktivität in den Extrakten 49 - Reinigung der Extrakte mit Methylenchlorid 51 - Umkristallisation 51

Diskussion 55

Zusammenfassung 65

Literaturverzeichnis 67

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung		Seite
1	UV-Photographie eines Dünnschichtchromatogramms des gereinigten ^{3}H-Nik mit angelegter Registrierkurve der Radioaktivität	4
2	Acetaldehyd-Eichkurve	14
3	Dünnschichtchromatogramm eines Leberextraktes mit angelegter Registrierkurve des Scanners	19
4	UV-Spektrum von Nikethamid	19a
5	Rechromatogramm von NS mit angelegter Registrierkurve des Scanners	21
6	Rechromatogramm von NSA mit angelegter Registrierkurve des Scanners	21
7	UV-Spektrum von NSÄA	23
8	UV-Spektrum vom Hydrojodid des quaternären N-Methylnicotinsäuremonoäthylamid	23a
9	Dünnschichtchromatogramm eines Leberextraktes Kontrolltier und nach Vorbehandlung mit α-HCH ...	31
10	UV-Spektrum von Nikethamid-N-oxyd	33
11	UV-Spektrum von NSA	38
12	Urinchromatogramm eines Kontrolltieres mit angelegter Registrierkurve der Radioaktivität ...	40
13	Urinchromatogramm eines mit α-HCH vorbeh.Tieres mit angelegter Registrierkurve der Radioaktivität	40
14	Urinchromatogramm eines mit Nik vorbeh.Tieres mit angelegter Registrierkurve der Radioaktivität	40
15	Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschichtchromatogrammen für Extrakte aus Herz, Skelettmuskel, Niere und Lunge	42a
16	UV-Spektrum einer unbekannten aus dem Urin isolierten Substanz x_1	45
17	UV-Spektrum der Substanz y aus dem Urin	45
18	UV-Spektrum vom Hydrojodid des quaternären N-Methyl-Nikethamid	52
19	Autoradiogramm einer Maus, getötet in starken Rollkrämpfen nach i.v.Injektion von ^{3}H-Nikethamid	62

Der Stoffwechsel des Nikethamid bei der Ratte und seine Beeinflußbarkeit durch Isomere des Hexachlorcyclohexan

N i k e t h a m i d ist etwa zur gleichen Zeit wie Cardiazol um 1920 bekannt geworden. Die Grundsubstanz, von der es sich herleitet, ist die Nicotinsäure. Während es sich bei dieser Säure um einen wenig giftigen, fast indifferenten Körper handelt, gelangt man durch Einführung einer Amidogruppe und durch die Alkylierung dieser Gruppe zu Substanzen mit definierten pharmakologischen Eigenschaften (41). Nach Uhlmann (62) nimmt das Pyridin-ß-carbonsäurediäthylamid (Coramin) innerhalb dieser Gruppe von Verbindungen eine dominierende Stellung ein, da es eine dem Kampfer fast identische Wirkung besitzt. Nikethamid ist ein wirksames Analeptikum für Atmung und Kreislauf (31). Seine Wirkungsweise ist von der Dosierung abhängig. Während kleine Dosen rein erregend wirken, schlägt mit steigender Dosierung diese Erregung allmählich in eine Lähmung um (31,40). Der bevorzugte Angriffspunkt des Nikethamid scheint die Medulla oblongata zu sein (31).

Die H e x a c h l o r c y c l o h e x a n e (HCH) wurden zum erstenmal im Jahre 1824 dargestellt, und zwar durch direkte Vereinigung von Chlor und Benzol in Gegenwart von Licht. Dieses aus Chlor und Benzol synthetisierte sogenannte technische HCH stellt ein Gemisch isomerer Hexachlorcyclohexane mit einigen anderen Chloradditions- und Chlorsubstitutionsprodukten dar. Durch fraktionierte Kristallisation aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln ist das Gemisch in fünf stereoisomere Hexachlorcyclohexane, nämlich α-, ß-, γ-, δ- und ε-HCH, zerlegt worden.

In amerikanischen und englischen Patenten ist das Isomerengemisch der HCH vor 28 Jahren zum erstenmal als insektizides Mittel bezeichnet worden. Von den verschiedenen Isomeren zeichnet sich die γ-Verbindung durch hohe kontaktinsektizide Wirksamkeit aus (58). Sie wirkt nach Verabreichung einer höheren Dosis als Krampfgift (17,38).

Injiziert man Ratten nach einmaliger oraler Gabe von HCH 4 bis 5 Tage nach der Vorbehandlung eine sicher krampfauslösende Dosis der Krampfgifte Cardiazol (32,33,39), Pikrotoxin (18), Coramin (18,37,39), Strychnin (33,34,35), Prostigmin (36,37), Mintacol (18,56), Scillirosid (64) oder Parathion (8), so bleiben die zu erwartenden Krämpfe aus, und die Tiere sind über einen längeren Zeitraum resistent gegen die Krampfgifte.

Herken und Mitarbeiter (17,33,34,35,36,37,38,39) versuchten in zahlreichen Untersuchungen, die krampfhemmende Wirkung der HCH aufzuklären. Sie fanden dabei Anhaltspunkte dafür, daß die HCH am Zentralnervensystem angreifen und dort die Funktion der Nervenzellen (17,37) oder deren Stoffwechsel (39) so verändern, daß die konvulsive Wirkung zahlreicher Krampfgifte nicht mehr zustandekommen kann. Für einen Angriffspunkt am Zentralnervensystem spricht, daß die HCH auch dann eine Krampfhemmung hervorrufen, wenn Cardiazol i.v. injiziert wird. Ferner zeigte sich eine deutliche Schutzwirkung der ß-Isomeren gegenüber elektrisch induzierten Krämpfen (38).

Es gibt auch eine Reihe von Argumenten, die dafür sprechen, daß die HCH Aktivatoren der mikrosomalen Enzyme sind und der beobachtete Wirkungsverlust einiger Krampfgifte auf deren beschleunigter Entgiftung beruht (37,64). So konnte Vohland (64) für den Toxizitätsverlust des Mintacol nach Vorbehandlung mit HCH-Isomeren eine Steigerung der Mintacolspaltung um 70 bis 90 % der Norm durch Enzyme der Lebermikrosomen nachweisen. Um zu zeigen, daß auch der Wirkungsverlust anderer Krampfgifte auf eine beschleunigte Metabolisierung zurückzuführen ist, muß man den Stoffwechsel dieser Substanzen kennen. Da der Stoffwechsel des Nikethamid noch weitgehend ungeklärt ist - es liegen nur einige Ergebnisse von R.A.Coulson und C.A.Stewart (20) vor, die zeigen konnten, daß im Urin von normalen Neugeborenen nach Verabreichung von Nikethamid vermehrt N-Methylnicotinsäureamid ausgeschieden wird -, untersuchten wir den Nikethamid-Abbau in vitro und in vivo und bemühten uns, durch vergleichende Versuche zwischen unvorbehandelten und mit HCH-Isomeren vorbehandelten Tieren einen weiteren Beitrag zum Wirkungsmechanismus der HCH zu liefern.

Methoden

1) Substanzen

a) α-, ß- und γ-HCH lieferte uns chemisch rein C.H.Boehringer Sohn, Ingelheim. Wir kontrollierten die Schmelzpunkte der Isomeren; sie stimmten mit den in der Literatur angegebenen überein.

b) Nikethamid (Pyridin-3-carbonsäure-N, N-diäthylamid, Coramin^R, Nik) erhielten wir von der Ciba AG, Basel. Die Substanz war chromatographisch rein (Dünnschicht).

c) ^{3}H-markiertes Nikethamid wurde nach der Methode von Eidinoff hergestellt von Dr.Schultze, Isotopenlabor der Schering AG, Berlin. Das Syntheseprodukt enthielt etwa 10 % Nicotinsäure, die durch dreimalige Extraktion der Methylenchlorid-Lösung mit $\frac{n}{10}$NaOH entfernt wurde. Das so gereinigte ^{3}H-Nik war nicht beständig. Es bildeten sich beim Stehen kleine Mengen Nicotinsäure neben zwei weiteren Verunreinigungen, die sich im Dünnschicht-System 1 (s. Kapitel Dünnschichtchromatographie, S.6) abtrennen ließen. Vor ihrer Verwendung wurde die Substanz daher stets durch Dünnschichtchromatographie gereinigt. Die Reinheit wurde durch Rechromatographie im gleichen System geprüft (Abb.1). Es sind keine Verunreinigungen des Nik sichtbar oder registrierbar. Der Anteil noch vorhandener Verunreinigungen muß unter 0,5 % liegen.

Die spezifische Aktivität des ^{3}H-Nik betrug nach dieser Reinigung 110 µC/µMol. Es wurde für die Tierversuche mit nicht markiertem Nik verdünnt. Die daraus resultierenden spezifischen Aktivitäten werden bei der Beschreibung der Versuche genannt.

d) Nicotinsäuremonoäthylamid (Pyridin-3-carbonsäure-N-äthylamid, NSÄA) wurde synthetisiert im Organisch-Chem.Institut der FU, Berlin. Das Produkt war chromatographisch nicht rein. Als Verunreinigung enthaltene Nicotinsäure wurde durch Verteilung des Gemisches zwischen $\frac{n}{10}$NaOH und Methylenchlorid abgetrennt.

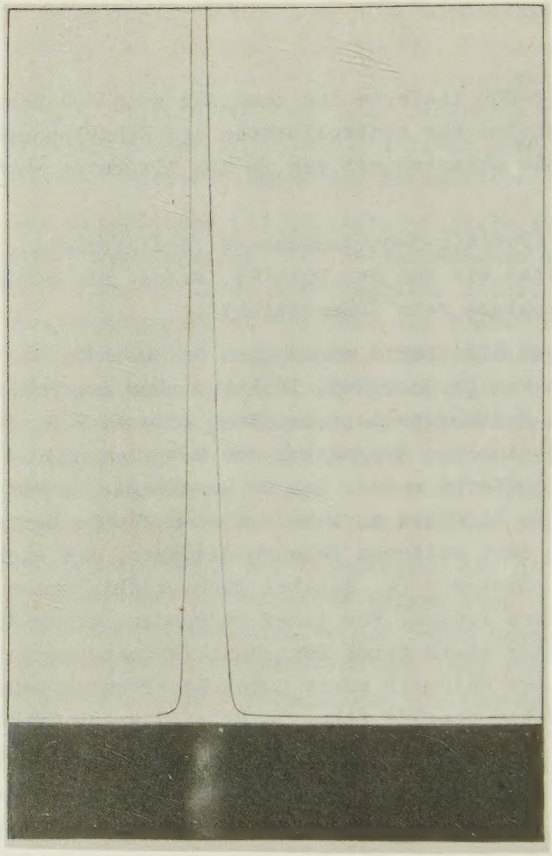


Abb.1: UV-Photographie eines Dünnschichtchromatogramms des gereinigten ^{3}H-Nik (unten) mit angelegter Registrierkurve der Radioaktivität (oben). Empfindlichkeit des Strahlungsmeßgerätes $2 \cdot 10^4$ Ipm bei Vollausschlag. Dämpfung 5 sec.

Dabei bleibt die Nicotinsäure in der wäßrigen Phase, während NSÄA in die organische Phase übergeht. Methylenchlorid wurde abdestilliert, der Rückstand mehrfach aus Cyclohexan umkristallisiert. Die gereinigte Substanz war in den Dünnschicht-Systemen 1,2,3 (s. Kapitel Dünnschichtchromatographie, S.6) rein, ihr Schmelzpunkt lag bei 53 bis 54°C. (57°C nach Chem.Abstracts 36, S.6541[8],1942).

e) Nicotinsäureamid (NSA), Nicotinsäure (NS) erhielten wir von Merck. Beide Substanzen erwiesen sich dünnschichtchromatographisch als rein.

f) TPNH (Triphosphopyridin-nucleotid reduziert) bezogen wir von C.F.Boehringer Söhne GmbH, Mannheim.

g) Nikethamid-N-oxyd (Pyridin-1-oxyd-3-carbonsäure-N, N-diäthylamid, Nik-N-oxyd). Bei dem N-oxyd des Nik handelt es sich um eine noch nicht in der Literatur beschriebene Substanz. Bekannt sind aber die N-oxyde der Nicotinsäure und des Nicotinsäureamid. Wir synthetisierten daher das Nik-N-oxyd analog der von Clemo und Koenig (13) beschriebenen Synthese des NS-N-oxyds auf folgende Weise:

3,3 g Nik wurden mit 8,0 ml 30%igem Wasserstoffperoxyd und 50 ml Eisessig 4 Stunden in einem Rundkolben mit Rückflußkühler erhitzt. Dann wurde der Ansatz mit 100 ml Aqua dest. verdünnt und eingedampft. Dabei erhielten wir einen öligen Rückstand, der zur Entfernung noch vorhandener Essigsäure mehrmals in Wasser aufgenommen und wieder eingedampft wurde. Anschließend führten wir eine Hochvakuumdestillation bei 170°C und 0,5 mm Hg aus und erhielten dabei gelbe Kristalle, die sich als extrem hydrophil erwiesen und daher an der Luft nicht beständig waren. Der Schmelzpunkt dieser von uns dargestellten Substanz lag bei 45°C. Um uns Gewißheit darüber zu verschaffen, daß unser Syntheseprodukt der Summenformel ($C_{10}H_{14}N_2O_2$) nach mit Nik-N-oxyd identisch ist, ließen wir von der Schering AG eine Mikroanalyse durchführen. Der bei dieser Untersuchung gefundene prozentuale Anteil der einzelnen Elemente stimmte mit dem theoretisch errechneten gut überein (Tab.1). Wir nehmen daher an, daß es sich bei der von uns synthetisierten Substanz um das Nik-N-oxyd handelt.

	C	H	N	O
①	61,84	7,22	14,44	16,50
②	62,10	7,24	14,21	16,46

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der Elemente C,H,N,O im Nik-N-oxyd.
Spalte ① gibt den theoretisch errechneten Anteil der Elemente,
Spalte ② die mit Hilfe der Mikroanalyse bestimmten Werte in Prozent wieder.

h) Nicotinsäuremonoäthylamid-N-oxyd, Nicotinsäureamid-N-oxyd und das N-oxyd der Nicotinsäure stellten wir uns auf die gleiche Weise nach der eben beschriebenen Synthese von Clemo und Koenig (13) her. Die Schmelzpunkte und UV-Spektren dieser Verbindungen stimmten, soweit sie beschrieben sind, mit den in der Literatur (13) angegebenen überein.

2) Dünnschichtchromatographie

Zur Herstellung der Sorptionsschicht wurde Kieselgel HF_{254} nach Stahl (Merck) im Verhältnis 1:2 mit Wasser verdünnt und mit Hilfe eines Streichgerätes 0,3 mm dick auf Glasplatten (20 x 20 cm) aufgetragen. Die Platten wurden anschließend 2 Stunden bei 130°C getrocknet und im Exsikkator aufbewahrt.

Als Fließmittel wurden hauptsächlich die beiden folgenden Systeme benutzt:

System 1:	Benzol	70 Vol.
	Methanol	20 Vol.
	Aceton	5 Vol.
	Eisessig	5 Vol.
System 2:	Chloroform	90 Vol.
	Äthanol	40 Vol.

Daneben verwendeten wir noch die Systeme 3 und 4:

System 3:	i-Propanol	45 Vol.
	Chloroform	45 Vol.
	Ammoniak	10 Vol.
System 4:	Wasser	95 Vol.
	Äthanol	5 Vol.

Zur Isolierung von NSÄA aus Gewebsextrakten eignete sich besonders System 2, von NS System 1.

R_f-Werte:

	System 1	System 2
Nik	0,54	0,77
NSÄA	0,43	0,65
NSA	0,28	0,41
NS	0,38	0,09

Die Lokalisation der Substanz erfolgte anhand der Fluoreszenzlöschung bei aufscheinendem UV-Licht.

Anfertigung einer UV-Photokopie zur Dokumentation der Dünnschichtchromatogramme:

Agfa-Copex-Papier wurde mit der empfindlichen Seite unter das zu kopierende Dünnschichtchromatogramm gelegt und mit einer Glasplatte angepreßt. Dann ließen wir für einige Sekunden UV-Licht (254 mμ) durch die Schicht hindurch auf das Photopapier fallen und entwickelten das Negativ.

3) Messung der Radioaktivität

a) Die Messung des Tritiums erfolgte mit Hilfe des Flüssigkeits-Scintillationszählers "Tricarb" der Fa.Packard. Als Scintillatoren wurden 8 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 100 mg Dimethyl-POPOP (1,4 bis 2 (4-Methyl-5-Phenyl-Oxazolyl) Benzol) gelöst in 2 l Toluol verwendet. Für die Messung wäßriger Tritiumproben wurde Äthanol als Lösungsvermittler benutzt:

0,1 ml Wasser
2,0 ml Äthanol
8,0 ml scintillatorhaltiges Toluol.

Zur Korrektur des Zählfehlers wurde den Proben tritiiertes Toluol bekannter spezifischer Aktivität zugesetzt.
Die Berechnung der in den Tricarbgefäßen enthaltenen Radioaktivität in Curie erfolgte nach folgenden Gleichungen:

$$Ipm_{Mess.} \cdot \frac{Zpm_{trit.}}{Ipm_{trit. + Mess.} - Ipm_{Mess.}} = Zpm_{Mess.}$$

$$\frac{Zpm_{Mess.}}{2,22 \cdot 10^{12}} = C$$

$Ipm_{Mess.}$ = Anzahl der gemessenen Impulse/min./0,1 ml der wäßrigen Tritiumprobe

$Ipm_{trit.+Mess.}$ = Anzahl der gemessenen Impulse/min./0,1 ml der wäßrigen Tritiumprobe nach Zusatz von 0,1 ml tritiierter Toluol-Standard-Lösung mit bekannter Anzahl von Zerfällen/min./ml

$Zpm_{trit.}$ = Zerfälle/min./0,1 ml der tritiierten Toluol-Standard-Lösung

$Zpm_{Mess.}$ = errechnete Anzahl von Zerfällen/min./0,1 ml der wäßrigen Tritiumprobe

C = Curie

b) Die Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtchromatogrammen wurde mit Hilfe des Dünnschicht-Scanners der Fa.Berthold in Verbindung mit einem fensterlosen Gasstromzählrohr, dem Strahlungsmeßgerät FH 49 und dem Potentiometerschreiber FH 585 der Fa.Friesecke und Höpfner registriert. An das Zählrohr wurde eine Spannung von 2,9 KV angelegt, als Zählgas diente Methan. Der Vorschub der Platten und des Registrierpapiers erfolgte mit 600 mm/h.

Die Zählausbeute des Dünnschicht-Scanners untersuchten wir auf folgende Weise: auf 3,5 cm (Länge des Spaltes des Strahlungsmeßgerätes) einer Dünnschichtplatte trugen wir 0,1 ml ^{3}H-Nik $\hat{=}$ $2,64 \cdot 10^{-5}$ C auf. Die Größenordnung dieser Aktivität entsprach etwa der auf unseren Versuchschromatogrammen. Wir registrierten nun bei zwei verschiedenen Empfindlichkeiten die Impulse des Nik-Chromatogrammes. Um einen Leerwert zu erhalten, ließen wir das Zählrohr noch über den leeren Flächenanteil dieses Chromatogrammes gleiten.

Mit dem Strahlungsmeßgerät FH 49 gemessene Impulse:

1) Empfindlichkeit	$4 \cdot 10^3$ Ipm bei Vollausschlag	
Meßwert	16074 Imp.	
Leerwert	427 Imp.	
	15647 Imp.Netto $\cdot$ 4 =	62588 Imp.
2) Empfindlichkeit	$2 \cdot 10^3$ Ipm bei Vollausschlag	
Meßwert	31928 Imp.	
Leerwert	879 Imp.	
	31049 Imp.Netto $\cdot$ 2 =	62098 Imp.

Mittelwert: 62343 Imp.
eingesetzt: $585 \cdot 10^5$ Zpm = $2,64 \cdot 10^{-5}$C
gewonnen: $623 \cdot 10^2$ Zpm = $2,79 \cdot 10^{-8}$C
Die Zählausbeute betrug also 0,11 %

4) Isotopenverdünnungsmethode

Die Isotopenverdünnungsmethode ist ein Beimischungsverfahren, das für die Analyse von Stoffen, die in kleinen Mengen anfallen, verwendet wird. Wir injizierten Ratten eine ^{3}H-Nik-Lösung bekannter spezifischer Aktivität s_a und bestimmten zum Zeitpunkt des Auftretens von Krämpfen die Menge x des noch nicht abgebauten ^{3}H-Nik in verschiedenen Organen auf folgende Weise: Den Organextrakten wurde eine bestimmte Menge y an inaktivem Nik hinzugesetzt, wobei y groß gegenüber der eingesetzten Gewichtsmenge an ^{3}H-Nik war. Durch Kristallisation isolierten wir das Nik wieder in Form des Hydrojodid des N-Methylnicotinsäurediäthylamid aus dem Extrakt und reinigten die Substanz durch mehrfaches Umkristallisieren. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde nach jeder Umkristallisation ein aliquoter Teil der Substanz abgenommen und das Verhältnis von Aktivität zu Gewicht berechnet. An Stelle des Gewichtes bestimmten wir die UV-Absorption als Maß für die Konzentration. Bleibt die spezifische Aktivität s_b konstant, so kann man sicher sein, daß es sich um den gesuchten Stoff (Identitätsnachweis) handelt.
Die gesuchte Menge x an aktivem Nik ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$x = \frac{s_b \cdot y}{s_a}$$

5) Autoradiographie

Einer weiblichen Maus von 19 g Gewicht wurden 8 mg ^{3}H-Nik = 2,3 μC, in 0,1 ml Wasser gelöst, in die Schwanzvene appliziert. Nach einer halben Stunde, als starke Rollkrämpfe auftraten, wurde das Tier mit Äther narkotisiert und im Aceton-Kohlensäureschnee (-70°C) getötet. Sagittalschnitte von 30 μ bzw. 50 u wurden in verschiedenen

Ebenen angefertigt und die Schnitte auf Ilford Platten Typ G 5, Schichtdicke 50 μ, exponiert. Die Expositionszeit betrug 21 Tage.

6) Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit Hilfe eines Kofler-Schmelzpunkt-Mikroskopes.

7) Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem automatisch registrierenden Beckmann Spektrophotometer Modell DK II aufgenommen.

8) Tierversuche

Für die Tierversuche verwendeten wir weibliche Albinoratten im Gewicht von 150 bis 200 g, die mit standardisiertem Preßfutter und Leitungswasser ernährt wurden. Bei den Versuchen mit Hexachlorcyclohexan wurde den Tieren 200 mg/kg α-HCH (2 %ig in Rapsöl gelöst) oder 200 mg/kg ß-HCH (1 %ig in Rapsöl gelöst) oder 60 mg/kg γ-HCH (0,6 %ig in Rapsöl gelöst) i.p. injiziert. Am 5.Tag nach der Injektion töteten wir die Tiere. Bei den Nik-Gewöhnungsversuchen erhielten die Tiere an 5 aufeinander folgenden Tagen durch i.p.Injektion jeweils 200 mg Nik/kg und wurden am 5.Tag nach der ersten Injektion getötet.

a) Versuche zum Nikethamid-Stoffwechsel in vitro

Darstellung eines kern- und mitochondrienfreien Zellhomogenats

Die Ratten wurden durch Dekapitation getötet und die Lebern nach dem Ausbluten der Tiere entnommen. 2 g Lebergewebe wurden in 8 ml einer eiskalten Lösung folgender Zusammensetzung (57)

$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer ph 7,4		20 Vol.
KCl	1,15 %	77 Vol.
Glucose	5,5 %	3 Vol.

unter Verwendung eines Potter-Elvehjem Homogenisators aus Plexiglas homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min. bei 6600 · g in einer Kühlzentrifuge (Fa.Phywe) bei 0°C zentrifugiert und der Überstand vom Sediment (Kerne, Mitochondrien, ganze Zellen) abgetrennt.

Inkubationsbedingungen

Die Versuchsansätze hatten folgende Zusammensetzung:
2,0 ml Enzympräparation (≙ 400 mg Leber)
29 bis 34 µMol ^{3}H-Nik (spezif.Aktivität 2 bis 4 · 10^{-6}C/µMol)
40 µMol $MgSO_4$
50 µMol Semicarbazid
10 µMol TPNH
ad 3,3 ml $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer ph 7,4

Die Inkubation erfolgte in 25 ml fassenden Erlenmeyer-Kölbchen, die in einem Wasserbad von 37°C 90 min. geschüttelt wurden. Die Gasphase war Luft.
Bei Verwendung von TPN an Stelle von TPNH gelang es uns nicht, Metaboliten des Nik nachzuweisen.

Isolierung von Nikethamid und Nicotinsäureäthylamid

Nach Beendigung der Inkubation wurde 1 ml des Versuchsansatzes für die Acetaldehyd-Bestimmung abgenommen. Der Rest wurde durch Hitze (1 min. in siedendem Wasser) denaturiert, zentrifugiert und vom Überstand 0,3 ml auf 3,5 cm einer Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Fließmittel wurde System 2 benutzt. Die Nik-, die NSÄA-Banden und die beiden entsprechenden Leerwerte wurden von den Dünnschichtplatten abgekratzt, mit $\frac{n}{10}$ HCl eluiert und in einem Beckmann Photometer DB die Extinktionen für Nik bei λ = 264 mµ, für NSÄA bei λ = 262 mµ gemessen. Die spezifischen Extinktionen des Nik und des NSÄA in $\frac{n}{10}$ HCl wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen bestimmt. Sie betrugen für Nik E_{264} = 5340 und für NSÄA E_{262} = 6155 (c = 1 · 10^{-3}Mol/cm^3; d = 1 cm).
Mit Hilfe der gemessenen Extinktionen wurde die Menge des entstandenen NSÄA bzw. des nicht abgebauten Nik in µMol nach folgender Gleichung berechnet:

$$\mu\text{Mol NSÄA} = \frac{E_{262} \cdot 33}{6{,}155} \; ; \quad \mu\text{Mol Nik} = \frac{E_{264} \cdot 55}{5{,}340}$$

Der Faktor 33 bzw. 55 ergab sich aus folgender Überlegung:
Von 3,3 ml Inkubat wurden 0,3 ml auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Die NSÄA-Bande wurde mit 3 ml $\frac{n}{10}$ HCl, die Nik-Bande mit 5 ml $\frac{n}{10}$ HCl eluiert. Die gemessene Extinktion war daher mit 3 · 11 bzw. mit 5 · 11 zu multiplizieren.

Zur Bestimmung des Verlustes, der bei der Isolierung von Nik und NSÄA auftrat, wurden Versuchsansätze mit der oben beschriebenen Zusammensetzung sofort nach dem Einpipettieren zur Denaturierung 1 min. lang in kochendes Wasser gehalten. Um den entsprechenden Verlust für das NSÄA zu erhalten, wurde das Nik durch eine gleiche Menge NSÄA ersetzt. Die Aufarbeitung der Versuchsansätze erfolgte in der oben beschriebenen Weise. Von dem eingesetzten Nik gewannen wir als Mittelwert von mehreren Messungen 80,5 % zurück, von dem eingesetzten NSÄA 81,6 %. Wir rechneten daher bei der Isolierung von Nik und NSÄA mit einem Verlust von 20 %.

Bestimmung von Acetaldehyd (AcA)

Der während der Inkubation freigesetzte AcA wurde als Semicarbazon abgefangen, aus dieser Bindung durch H_2SO_4 freigesetzt, durch Mikrodiffusion in eine Bisulfitlösung überführt und anschließend quantitativ mit Hilfe des colorimetrischen Verfahrens nach Stotz (60) bestimmt. Im einzelnen war der Untersuchungsgang folgender:

Nach der Inkubation wurde von den Inkubaten, die - wie bereits erwähnt - 50 µMol Semicarbazid · HCl enthielten, jeweils 1 ml pro Ansatz abgenommen und in ein Zentrifugenglas pipettiert, das 0,9 ml 10%iges Wolframat, 0,1 ml 10nH_2SO_4 und 1 ml H_2O enthielt. Das Praecipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt. Von dem Überstand wurden 2 ml in den äußeren Teil eines Conway-Schälchens gegeben, in dem sich ebenfalls außen - jedoch getrennt vom zugesetzten Gewebsextrakt - 1 ml conc.H_2SO_4 und in der Mitte 1 ml 2%ige Bisulfitlösung befanden. Das Schälchen wurde gasdicht mit einer Glasplatte verschlossen und dann vorsichtig geschüttelt, so daß die conc.H_2SO_4 mit dem Gewebsextrakt in Berührung kam und vorhandenen AcA freisetzen konnte, der dann durch Mikrodiffusion in die Bisulfitlösung gelangte und dort gebunden wurde. Nach 4 Stunden wurden die Schälchen wieder geöffnet und 0,5 ml der Bisulfitlösung in Reagenzgläser pipettiert, die 0,025 ml 5%$CuSO_4$ enthielten. Dazu wurden unter Kühlen 4 cm^3 conc.H_2SO_4 und 0,1 cm^3 1,5% p-Hydroxybiphenyl in 0,5nNaOH gegeben. Zur schnelleren vollständigen Ausbildung der Farbreaktion wurden die Gläser 30 min.

in ein Wasserbad von 37° gebracht. Die Extinktion des entstandenen Farbstoffes, der chemisch nicht genau definiert ist, wurde an einem Beckmann-Spektrophotometer Modell DU bei λ = 570 mμ gemessen.

Die Farbreaktion wurde bei jeder Analyse kontrolliert. Dazu wurden verschiedene Einwaagen von Acetaldehyd sowie von Paraldehyd gemacht. Die dabei erhaltenen Werte ergaben die in Abb.2 dargestellte Eichkurve. Der molare Extinktionskoeffizient betrug nach diesen Daten ε = 11260 (λ = 570 mμ, d = 1 cm).

Um den während der Aufarbeitung der Versuchsansätze eintretenden Verlust an Acetaldehyd kontrollieren zu können, wurde AcA-Semicarbazon auf folgende Weise hergestellt: 5 g Semicarbazid · HCl wurden zusammen mit 5 g Na-Acetat in 15 ml H_2O gelöst. Nach Hinzufügen von 1,5 ml AcA erfolgte die Kristallisation bei 4°C. Die Kristalle wurden abgenutscht, mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Die Ausbeute betrug 1,69 g; der Schmelzpunkt lag bei 163°C (162°C nach Beilstein, Handbuch der Organ.Chemie, Bd.III,S.101). Da es sich zeigte, daß das AcA-Semicarbazon in wäßriger Lösung langsam zerfällt, wurde es vor Gebrauch immer neu dargestellt.

Bekannte Mengen AcA-Semicarbazon wurden Inkubationsansätzen zugefügt, die - wie oben beschrieben - zusammengesetzt waren, jedoch kein Nikethamid enthielten. In Tabelle 2 ist das Ergebnis aller dieser Kontrollversuche zusammengestellt.

Tabelle 2:

nMol AcA Semicarbazon eingesetzt	nMol AcA gefunden	AcA in % der eingesetzten Menge
950	724,7	76,3
950	618,1	65,1
950	650,1	68,4
1000	660,7	66,1
1000	714,0	71,4
1000	779,9	77,8
1000	682,1	68,2
1000	639,4	63,9

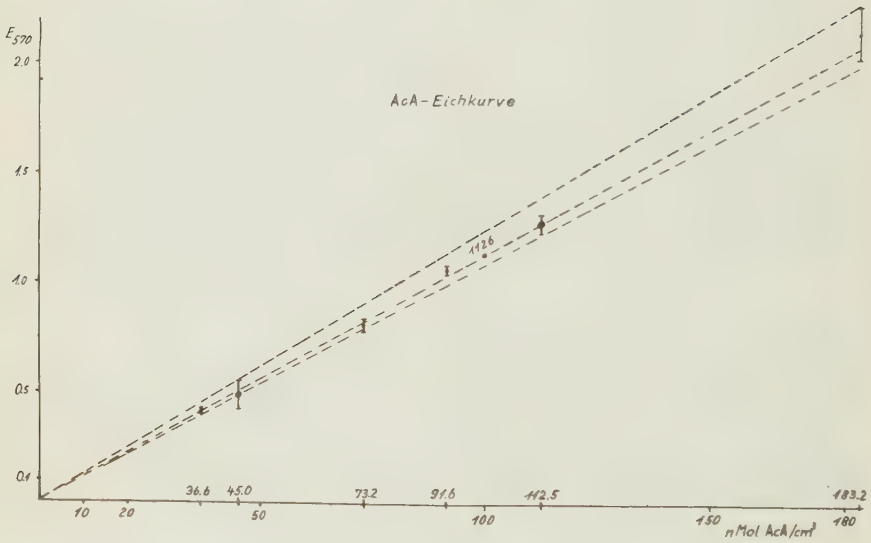


Abb.2: Extinktion bei λ = 570 mμ in Abhängigkeit von nMol AcA/cm³

· AcA als Eichsubstanz; Mittelwert aus 3 Meßwerten.

• Paraldehyd als Eichsubstanz; Mittelwert aus 5 bis 6 Meßwerten

Streubereich

Die Ausbeute an AcA betrug nach 90 min. Inkubation und anschließender Isolierung durchschnittlich 70 %. Der Verlust tritt wahrscheinlich während der Deproteinisierung ein. Als Semicarbazon in Conway-Kammern eingesetzter Acetaldehyd wird zu praktisch 100% wiedergefunden (9 Versuche).
Diese Kontrollversuche lassen die Möglichkeit außer Acht, daß während der Inkubation aus Nik freigesetzter AcA nicht quantitativ von dem vorhandenen Semicarbazid gebunden wird. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß der dadurch mögliche zusätzliche Verlust größenordnungsmäßig ins Gewicht fällt.

Bei der Gewinnung eines "Leerwertes" mußte berücksichtigt werden, daß die benutzte Enzympräparation während 90 min. Inkubation eine meßbare Menge AcA bildete. Es wurden daher jeweils zwei "Leer"ansätze parallel inkubiert und analysiert, von denen der eine kein Nik, der andere keine Enzympräparation enthielt. Die aus beiden Ansätzen erhaltenen Extinktionen wurden addiert und nach Abzug des Betrages für einen puren Wasserleerwert als Leerwert benutzt. Er entsprach sehr konstant einer AcA-Bildung von 0,2 µMol pro Gesamtansatz. Die AcA-Bildung in Gegenwart von Enzympräparation <u>und</u> Nik betrug mindestens das Fünffache dieses Wertes.

Die Umrechnung der so in den einzelnen Versuchen gewonnenen Netto-Extinktionen in µMol Acetaldehyd pro Gesamtansatz geschah mit Hilfe der Formel:

$$\mu\text{Mol AcA} = \frac{E_{570}\ \text{Netto} \cdot 9{,}9}{11{,}26}$$

Ableitung des Faktors 9,9:

3,3 ml Ansatz
davon 1,0 ml abgenommen zur AcA-Bestimmung
+ 1,0 ml H_2O
+ 1,0 ml Wolframat
3,0 ml

davon 2,0 ml zur Mikrodiffusion
davon 1,0 ml gemessen,
also

$$\frac{2 \cdot 3{,}3 \cdot 3}{2} = 9{,}9$$

11,26 = E_{570} für eine AcA-Konzentration von 1 µMol/cm^3.

b) Versuche zum Nikethamid-Stoffwechsel in vivo

140 bis 160 g schwere weibliche Ratten wurden mit α-HCH (200 mg/kg, 2%ig in Rapsöl gelöst) und Nik (200 mg/kg, 2%ig in Phosphatpuffer ph 7,4 gelöst) auf die gleiche Weise, wie bei den in vitro-Versuchen bereits beschrieben, vorbehandelt. Nach 5 Tagen wurden diesen Tieren und jeweils einem Kontrolltier 1,5 bis 2 ml einer ^{3}H-Nik-Lösung i.p. injiziert, deren spezifische Aktivität infolge verschiedener Ausbeuten bei der Reinigung zwischen $4,31 \cdot 10^{-6}$C/µMol und $7,54 \cdot 10^{-6}$/µMol schwankte. Die Tiere wurden anschließend vier Stunden ohne Nahrungszufuhr in Stoffwechselkäfigen gehalten und dann durch Dekapitation getötet. Wir untersuchten Blut, Leber, Gehirn, Herz, Niere, Lunge, Milz, Skelettmuskel, ferner Darm- und Magenschleimhaut, Urin und Stuhl. Vor der Verarbeitung wurden die Organe durch Abspülen mit Aqua dest. von anhaftendem Blut befreit, mit Filtrierpapier getrocknet und gewogen. Die Extraktion erfolgte zweimal mit Äthanol auf folgende Weise:

Die Organe wurden in Äthanol (etwa 10fache Organgewichtsmenge) homogenisiert, im Wasserbad bis zum Sieden erhitzt, und der Überstand wurde heiß durch ein Filter in einen Rundkolben gegossen. Zur besseren Trennung von Überstand und Sediment wurde nach dem Abgießen nachzentrifugiert. Das Äthanol wurde abdestilliert, der Rückstand dreimal mit 1 ml Methanol aufgenommen und ein aliquoter Teil auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Als Fließmittel wurde System 2 benutzt. Die Messung der Aktivitätsverteilung auf den Dünnschichtchromatogrammen erfolgte mit dem Dünnschicht-Scanner. Mit Hilfe eines Planimeters wurden die Flächen der einzelnen Peaks berechnet.

Ergebnisse

A Untersuchung des Nikethamid-Stoffwechsels in vitro

Da der Stoffwechsel des Nik bis auf Ergebnisse von R.A.Coulson und C.A.Stewart (20), die zeigten, daß im Urin von normalen Neugeborenen nach Verabreichung von Nik vermehrt N^1-Methyl-nicotinamid ausgeschieden wird, noch völlig ungeklärt war, bemühten wir uns zunächst mit Hilfe von Versuchen in vitro um die Aufklärung des Nik-Stoffwechsels.

Auf Grund der bisher vorliegenden Kenntnisse über Stoffwechselreaktionen an körperfremden Substanzen wären folgende Abbaumöglichkeiten des Nik denkbar:

1. eine Hydrolyse, wie sie z.B. bei der Entgiftung des Procain auftritt. Wir hätten dann Nicotinsäure als ein Stoffwechselprodukt des Nik zu erwarten.
2. eine Methylierung am N-Atom des Pyridinringes. Es würden N^1-Methyl-Nik oder dessen Derivate entstehen.
3. eine Desalkylierung. Das bekannteste Beispiel für diesen Reaktionstyp ist die Demethylierung des Pyramidon. Bei einer Desalkylierung des Nik müßten NSÄA oder NSA entstehen.
4. eine Oxydation zu einem Pyridon oder einem N-Oxyd.

Es ist bekannt, daß eine große Anzahl von Arzneimitteln, wie z.B. Amphetamin, Amidopyrin, Morphin, Codein, Phenacetin, Hexobarbital, Chlorpromazin und viele andere durch Fermentsysteme, die in den Lebermikrosomen verschiedener Tiere lokalisiert sind, abgebaut werden (1,2,3,4,5,15,27,52). Da wir damit rechneten, daß auch Nik durch die Einwirkung solcher Enzymsysteme verstoffwechselt wird, führten wir unsere Versuche unter ähnlichen Bedingungen durch, wie sie für diese Arzneimittel beschrieben wurden. Nik wurde mit einem kern- und mitochondrienfreien Rattenleberhomogenat bei Anwesenheit von TPNH und Mg-Ionen im Wasserbad von 37°C 90 min. inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Protein durch Hitze denaturiert, das Sediment durch Zentrifugieren abgetrennt und der

Überstand auf Dünnschichtplatten aufgetragen. Als Fließmittel benutzten wir System 2 (Genaue Beschreibung der Versuchsansätze und Versuchsbedingungen Seite 10).

Die Abb.3 zeigt das Dünnschichtchromatogramm eines Extraktes mit angelegter Registrierkurve des Scanners. Auf dem Chromatogramm sind 6 verschiedene Banden zu erkennen:

1) eine breite alle anderen an Intensität übertreffende Bande mit einem Rf-Wert von 0,77
2) eine schmalere Bande mit einem Rf-Wert von 0,65
3) eine schwache Bande; Rf-Wert 0,48
4) eine Bande mit einem Rf-Wert von 0,41
5) eine schwache Bande dicht oberhalb der Auftragefläche; Rf-Wert 0,09
6) eine am Start liegengebliebene Bande.

Wir bemühten uns um die Identifizierung dieser chromatographisch darstellbaren Substanzen.

Identifizierung der Bande 1

Folgende Ergebnisse sprachen dafür, daß es sich bei dieser Substanz um das eingesetzte, nicht abgebaute Nik handelt:

a) Bei dünnschichtchromatographischem Vergleich stimmten die Rf-Werte der Bande 1 mit denen von Nik in System 1 und System 2 überein.
b) Die Bande 1 wurde eluiert und das UV-Spektrum in $\frac{n}{10}$ HCl und $\frac{n}{10}$ NaOH aufgenommen. Es war identisch mit dem Nik-Spektrum (Abb.4).
c) Wir setzten die dünnschichtchromatographisch gewonnene Substanz an Stelle von Nik in die Versuchsansätze ein. Die Chromatogramme zeigten das oben beschriebene Bild, was ein Beweis dafür ist, daß es sich bei der Bande 1 um Nik handeln muß.

Die Bande 5

Nachdem wir das nicht verstoffwechselte Nik nachgewiesen hatten, bemühten wir uns, die einzelnen Abbauprodukte zu identifizieren. Es schien uns wahrscheinlich, daß das Nik hydrolytisch gespalten wird und daher NS als Reaktionsprodukt auftritt. Der Rf-Wert der Bande 5 stimmte in den Systemen 1 und 2 mit dem Rf-Wert der NS überein.

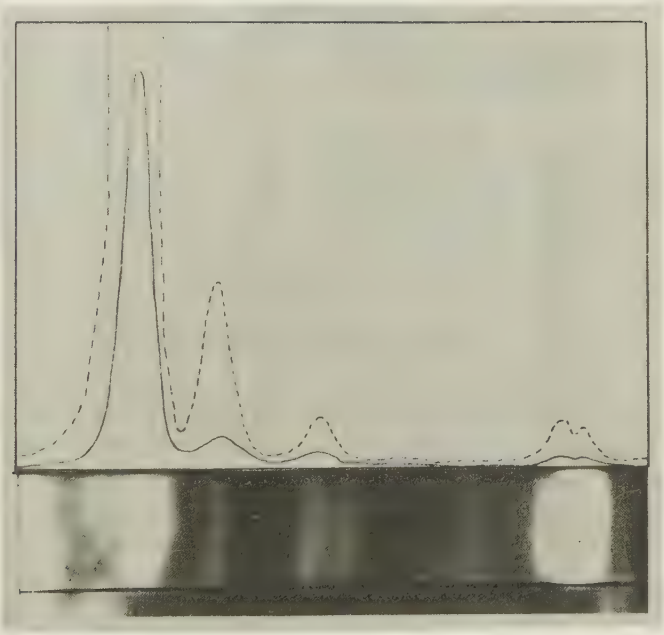


Abb.3: Dünnschichtchromatogramm eines Leberextraktes mit angelegter Registrierkurve des Scanners

- - - - - Empfindlichk.d.Strahlungsmeßger. $2 \cdot 10^3$ Ipm b.Vollausschlag, Dämpfung 20 sec.

——— Empfindlichk.d.Strahlungsmeßger. $2 \cdot 10^4$ Ipm b.Vollausschlag, Dämpfung 5 sec.

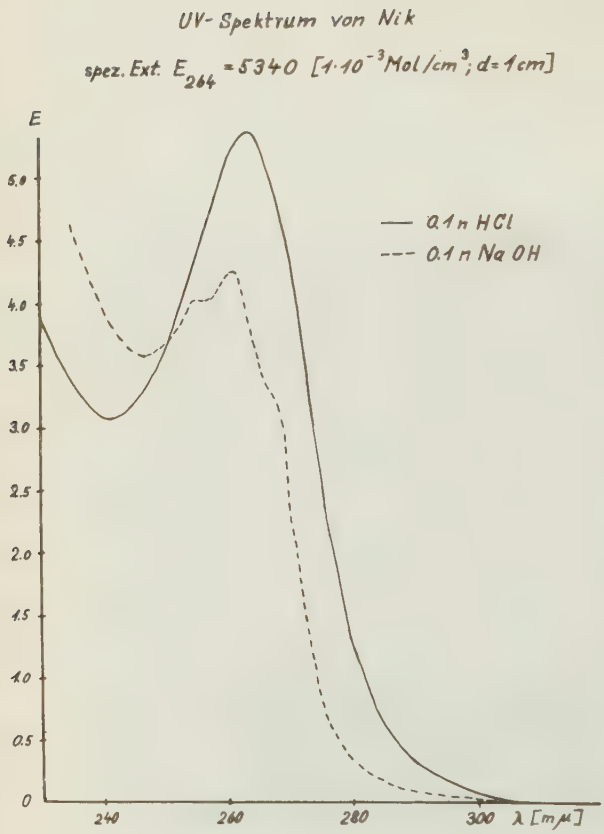


Abb.4: UV-Spektrum von Nikethamid

Wie die Abb.3 zeigt, konnten wir jedoch in der Höhe der Bande 5 keinen Aktivitätsausschlag registrieren. Dies beruht vermutlich darauf, daß NS durch Verdünnung mit körpereigener NS und durch Abspaltung der Tritium enthaltenden Seitenkette eine im Vergleich zum Nik geringere spezifische Aktivität besitzt. Um zu zeigen, daß Nik - wenn auch in sehr geringen Mengen - doch zu NS abgebaut wird, eluierten wir aus mehreren Ansätzen die Bande 5 mit Methanol aus den Chromatogrammen und rechromatographierten sie. Als Fließmittel wurde System 1 benutzt. Auf den Rechromatogrammen konnten wir dann einen der NS entsprechenden Radioaktivitätsausschlag registrieren (Abb.5).
Da die Substanz, die wir für NS halten, in so geringen Mengen auftrat, kann die hydrolytische Spaltung für den Stoffwechsel des Nik nicht von entscheidender Bedeutung sein, und der Abbau muß noch auf einem anderen Weg erfolgen. Wir untersuchten daher, ob sich evtl. Desalkylierungsprodukte des Nik nachweisen ließen.

Nicotinsäureamid und Nicotinsäuremonoäthylamid

Bei einer Desalkylierung des Nik müßte als Hauptstoffwechselprodukt NSA gebildet werden. NSA hat in den Systemen 1 und 2 die gleichen Rf-Werte wie die Bande 4 auf unseren Dünnschichtchromatogrammen (Abb.3). Ebenso wie bei der Bande 5 konnten wir auch in Höhe der Bande 4 keinen Aktivitätsausschlag registrieren. Erst nachdem wir von mehreren Ansätzen die Substanz mit Methanol aus den Chromatogrammen eluiert und rechromatographiert (System 1) hatten, erhielten wir eine dem NSA entsprechende Radioaktivitätszacke (Abb.6). Diese Untersuchungen zeigen, daß auch das NSA unter unseren Versuchsbedingungen in vitro kein Hauptmetabolit des Nik sein kann.

Da es denkbar war, daß bei der Desalkylierung des Nik zunächst nur eine Alkylgruppe abgespalten wird und dann NSÄA entstehen müßte, bestimmten wir die Rf-Werte dieser Substanz in den Systemen 1 und 2. Dabei ergab sich, daß NSÄA und die Bande 2 des Dünnschichtchromatogramms der Abb.3 in diesen beiden Systemen gleiche Rf-Werte besaßen. Wir führten nun weitere vergleichende Untersuchungen durch, um zu entscheiden, ob die Bande 2 mit NSÄA identisch ist.

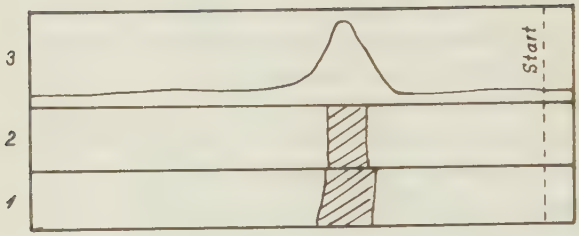


Abb.5:
Rechromatogramm von NS mit angelegter Registrierkurve des Scanners.
Fließmittel System 1;
Empfindl.d.Strahlungsmeßger.$2 \cdot 10^3$Ipm b.Vollausschlag,Dämpfung 20 sec

Spalte 1: isolierte Substanz
Spalte 2: Vergleichssubstanz
Spalte 3: Aktivitätsverteilungskurve

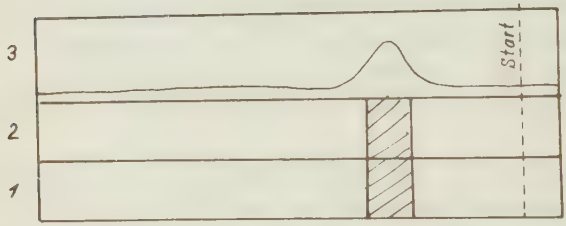


Abb.6:
Rechromatogramm von NSA mit angelegter Registrierkurve des Scanners.
Fließmittel System 1;
Empfindl.d.Strahlungsmeßger.$2 \cdot 10^3$Ipm b.Vollausschlag,Dämpfung 20 sec

Spalte 1: gewonnene Substanz
Spalte 2: Vergleichssubstanz
Spalte 3: Aktivitätsverteilungskurve

a) UV-Spektrum: Die auf den Dünnschichtchromatogrammen in der NSÄA-Position sich befindende Substanz wurde mit $\frac{n}{10}$ HCl eluiert und das UV-Spektrum in $\frac{n}{10}$HCl und in $\frac{n}{10}$ NaOH geschrieben. Es glich völlig dem Spektrum von authentischem NSÄA, das wir vom Organ.-Chem.Institut der FU erhielten und auf die auf Seite 3 und 5 beschriebene Weise reinigten. Die Absorptionskurven zeigt Abb.7. Das Ergebnis legte den Schluß nahe, daß es sich bei diesem Reaktionsprodukt des Nik um das NSÄA handelt. Einen sicheren Beweis aber lieferte

b) die Isotopenverdünnungsanalyse: Zu der aus mehreren Versuchen gewonnenen salzsauren Lösung des mit Tritium markierten Produktes wurden 315 mg des inaktiven NSÄA eingewogen, und das Ganze wurde mit 10n NaOH alkalisch gemacht. Wir schüttelten sechsmal mit 10 ml Dichlormethan aus, wobei das NSÄA in das Methylenchlorid überging. Nach Trocknen mit geglühtem Na_2SO_4 wurde das CH_2Cl_2 abdestilliert. Der Rückstand wurde in ein Zentrifugenglas überführt und Methyljodid im Überschuß hinzugegeben, das 24 Stunden bei Zimmertemperatur einwirkte und das NSÄA in das Hydrojodid des quaternären N-Methylnicotinsäuremonoaethylamid umwandelte. Es folgte sechsmaliges Umkristallisieren dieser Verbindung mit je 2 ml Isopropanol. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden jeweils 0,1 ml der in Isopropanol gelösten Kristalle abgenommen und mit $\frac{n}{10}$ HCl auf 10 ml aufgefüllt. Davon wurden 0,1 ml in die Tricarbgefäße pipettiert und die Aktivität gemessen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte jeweils durch Messung der Extinktion bei λ = 266 mμ. Nach sechsmaligem Umkristallisieren wurden die restlichen Kristalle mit Hexan gewaschen, getrocknet und zur Bestimmung der spezifischen Extinktion verwendet. Die Substanz hatte einen Schmelzpunkt von 86 bis 87°C; ihr Spektrum zeigt die Abb.8.

Wir machten drei verschiedene Einwaagen (5, 10 und 15 mg) und bestimmten jeweils die UV-Absorption. Aus dem Mittelwert ergab sich die spezifische Extinktion des Hydrojodid des quaternären N-Methyl-NSÄA mit E_{266} = 5090 ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ Mol/cm^3; d = 1 cm). Mit Hilfe dieses Wertes berechneten wir bei den einzelnen Kristallisationen die spezifischen Aktivitäten.

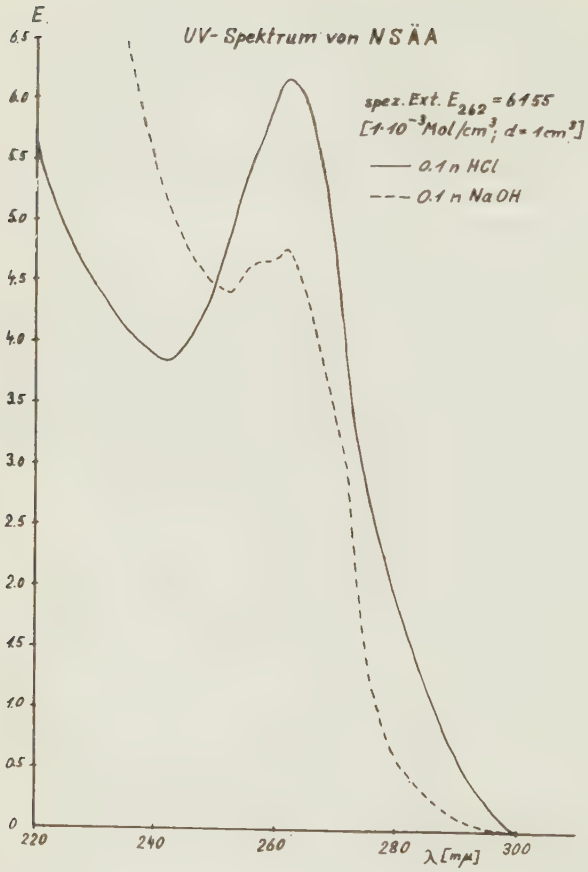


Abb.7: UV-Spektrum von NSÄA

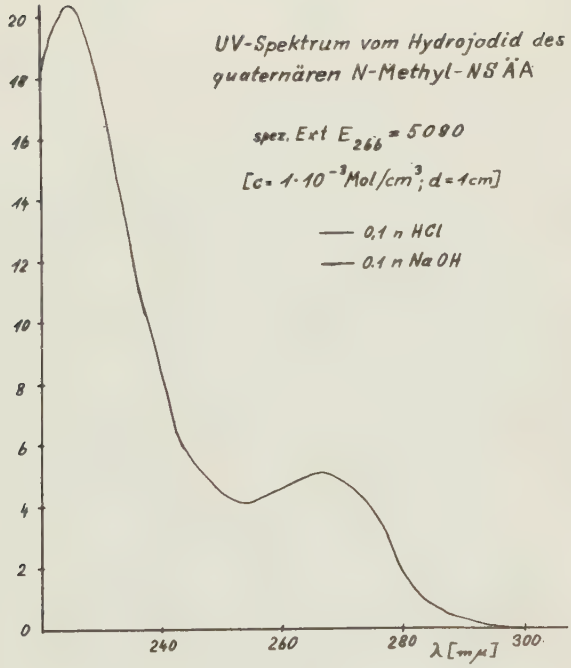


Abb.8: UV-Spektrum vom Hydrojodid des quaternären N-Methylnicotinsäuremonoäthylamid

Kristallisation	Spezifische Aktivität (nC/µMol)
1	8,97
2	9,03
3	8,51
4	8,45
5	8,24
6	8,70

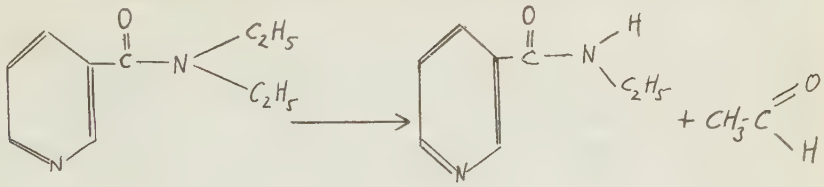
Die Tatsache, daß die radioaktive Substanz von der zugesetzten inaktiven durch Umkristallisation nicht abzutrennen ist, beweist die Identität der beiden Stoffe.

Die Freisetzung von Acetaldehyd während der Desäthylierung von Nikethamid

Der Nachweis von NSÄA als Metabolit des Nik zeigt, daß der erste Schritt im Stoffwechsel der Substanz eine N-Desalkylierung ist. N-Desalkylierungen sind bereits bei einer ganzen Anzahl körperfremder Stoffe beschrieben worden (1,5,4,14,26,44,47,51,59,61). Als Reaktionsprodukte wurden das freie Amin und der Alkylrest als Aldehyd nachgewiesen. Eines der bekanntesten Beispiele für diesen Reaktionstyp stellt der Abbau des Dimethylaminoantipyrin (Pyramidon) dar, wobei als Reaktionsprodukte Formaldehyd und 4-Aminoantipyrin gebildet werden (51). Die Desäthylierung von Nik sollte daher begleitet sein von der Freisetzung von Acetaldehyd.
Wir haben, um das zu prüfen, unseren Inkubationsansätzen Semicarbazid zugesetzt, wie das zuerst La Du et al. zum Abfangen des flüchtigen Aldehyds getan hatten bei ihren Untersuchungen mit Amidopyrin. Zur Isolierung des Aldehyds aus dem Homogenat benutzten wir Conways Methode der Mikrodiffusion und zu seinem Nachweis die Umsetzung mit p-Hydroxybiphenyl in schwefelsaurer Lösung in der von Stotz beschriebenen Modifikation (Versuchsanordnung s.S.12).

Derartige Versuche zeigten, daß tatsächlich bei der Bildung von NSÄA aus Nik durch Leberhomogenat die Äthylgruppe als Acetaldehyd freigesetzt wird. Die quantitative Bestimmung beider

Reaktionsprodukte ergab, daß sie in äquimolaren Mengen entstehen entsprechend folgender Gleichung:



In Tabelle 3 (S.26) sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt. Ein Vergleich der Werte in den Spalten II und III miteinander bzw. IV und V miteinander zeigt, daß die Menge des aus Nik gebildeten AcA mit der Menge des gleichzeitig entstandenen NSÄA gut übereinstimmt. So wurden z.B. nach Vorbehandlung der Tiere mit α-HCH 6,65 % des applizierten Nik zu AcA und 6,82 % zu NSÄA abgebaut. Die entsprechenden Werte betrugen nach Vorbehandlung mit ß-HCH 7,16 % und 7,25 % und nach Vorbehandlung mit γ-HCH 5,83 % und 5,33 %. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei gleichzeitig durchgeführten AcA- und NSÄA-Bestimmungen.
Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, stimmen die entsprechenden Zahlen auch bei den Kontrolltieren gut überein.

Bei Betrachtung der Werte in Tabelle 3 unter A, B, C, D jeweils II und III 4 und 5 bzw. IV und V 4 und 5 (Kontrolltiere) fällt auf, daß die Mittelwerte aus 2 Bestimmungen voneinander abweichen, d.h. daß man einmal gefundene Werte bei den Versuchstieren nicht als Grundlage für weitere Versuche benutzen kann, während die Ergebnisse der zum gleichen Zeitpunkt durchgeführten Tierversuche gut übereinstimmen. Um einen gültigen Vergleichswert zu erhalten, wurden daher zu jeder Versuchsserie Kontrollversuche durchgeführt.

Nach Vorbehandlung der Tiere mit HCH-Isomeren werden unter sonst gleichen Bedingungen etwa zwei- bis viermal soviel NSÄA und AcA gebildet wie bei unvorbehandelten. Nach unseren Ergebnissen sind die 3 HCH-Isomeren quantitativ verschieden wirksam. Nach

	I	II	III	IV	V
A					
1	30,96	2,149)	1,866)	6,94)	6,03)
2	30,96	1,897)2,06	2,191)2,12	6,13)6,65	7,08)6,82
3	30,96	2,126)	2,310)	6,87)	7,36)
4	30,96	0,559)0,6	0,449)0,52	1,81)1,94	1,45)1,67
5	30,96	0,640)	0,581)	2,06)	1,88)
B					
1	33,15	2,412)	2,640)	7,28)	7,96)
2	33,15	1,944)2,35	2,125)2,40	5,86)7,16	6,41)7,25
3	33,15	2,698)	2,442)	8,13)	7,37)
4	33,15	1,197)1,27	1,346)1,19	3,61)3,84	4,06)3,59
5	33,15	1,348)	1,030)	4,07)	3,11)
C					
1	34,11	2,126)	2,090)	6,23)	6,13)
2	34,11	1,383)1,99	1,571)1,82	4,05)5,83	4,61)5,33
3	34,11	2,456)	1,795)	7,20)	5,26)
4	34,11	0,458)0,57	0,779)0,86	1,34)1,68	2,29)2,52
5	34,11	0,686)	0,937)	2,01)	2,75)
D					
1	35,70	1,143)	1,571)	3,20)	4,40)
2	35,70	1,131)1,12	1,571)1,51	3,17)3,15	4,40)4,23
3	35,70	1,097)	1,386)	3,07)	3,88)
4	35,70	0,663)0,45	0,673)0,62	1,86)1,27	1,89)1,74
5	35,70	0,241)	0,568)	0,68)	1,59)

Tabelle 3:
Ergebnisse von in vitro-Versuchen, bei denen gleichzeitig der durch Leberhomogenat aus Nik entstandene AcA und das NSÄA quantitativ bestimmt wurden.

I µMol Nik eingesetzt
II µMol AcA entstanden (korrigiert f.Verlust von 30%)
III µMol NSÄA entstanden (korrig.f.Verlust v.20%)
IV AcA in % der eingesetzten Menge Nik
V NSÄA in % d.einges.Menge Nik

1-3 jeweils mit HCH-Isomeren oder Nik vorbehandelte Tiere
4-5 Kontrolltiere

A mit α-HCH vorbeh.Tiere u.Kontrolltiere
B mit ß-HCH vorbeh.Tiere u.Kontrolltiere
C mit γ-HCH vorbeh.Tiere u.Kontrolltiere
D mit Nik vorbeh.Tiere u.Kontrolltiere

} Mittelwert

Vorbehandlung mit α-HCH wird die vierfache,
ß-HCH die doppelte,
γ-HCH die dreifache Menge an NSÄA und AcA
gebildet im Vergleich zu unvorbehandelten Tieren.

Aus den Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß die Hexachlorcyclohexane "aktivierend" auf den Prozeß der Desalkylierung wirken, so daß die vorbehandelten Tiere das verabreichte Nik schneller abzubauen vermögen als die unvorbehandelten.

Die Desäthylierung von Nikethamid durch Lebermikrosomen HCH-vergifteter Tiere.

Da sich die beiden Reaktionsprodukte NSÄA und AcA quantitativ recht gut bestimmen ließen und wir uns als Aufgabe gestellt hatten, neben der Aufklärung des Nik-Stoffwechsels gleichzeitig seine Beeinflußbarkeit durch die HCH-Isomeren zu untersuchen, wiederholten wir die eben beschriebenen Versuche an Ratten, die mit HCH-Isomeren vorbehandelt worden waren. Die Tiere erhielten entweder α-HCH (200 mg/kg), ß-HCH (200 mg/kg) oder γ-HCH (60 mg/kg) i.p. und wurden am 5.Tag nach der Injektion getötet. Tabelle 3 (S.26) gibt unter A bis C eine Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Versuche.

Gewöhnung an Nikethamid

Brazda und Baucum (10) haben festgestellt, daß die Vorbehandlung von Tieren mit Nik die Geschwindigkeit der enzymatischen Entgiftung von Arzneimitteln in den Lebermikrosomen erhöht. Wir haben daher geprüft, ob nach wiederholter Verabreichung von Nik auch der Abbau der Substanz selbst beschleunigt erfolgt, und injizierten weiblichen Ratten an fünf aufeinander folgenden Tagen je 200 mg/kg Nikethamid intraperitoneal. Dabei war zu beobachten, daß die akuten Vergiftungssymptome, vor allem die zunächst sehr ausgeprägte motorische Erregung der Tiere, mit der Wiederholung der Injektionen deutlich abgeschwächt wurden, also eine Gewöhnung an die Nik-Dosis eintrat. Die Tiere wurden am Tage nach der letzten Injektion getötet und die Geschwindigkeit der Desäthylierung von Nik durch die Lebermikrosomen dieser Tiere untersucht. Das Ergebnis, in Tabelle 3 unter D dargestellt, zeigt, daß die mit Nik vergifteten Ratten die Substanz

gegenüber normalen Tieren etwa doppelt so schnell abzubauen vermögen.

Bei diesen Versuchen wurde nicht geprüft, ob geringe Mengen NSÄA bereits zu Beginn der Inkubation in den Enzympräparationen enthalten waren, die aus den Lebern der mit Nik vergifteten Tiere hergestellt wurden. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß die Menge an Metaboliten und an Nik nach einer Pause von 24 Stunden so groß ist, daß dadurch der Vergleich mit der Abbauleistung der Kontrolltiere unzulässig würde. Wir haben diese Ungenauigkeit nicht korrigiert, da wir die Frage der Gewöhnung an Nik in Versuchen in vivo (S.42) gleichfalls geprüft und dabei eindeutig festgestellt haben, daß die wiederholte Verabreichung des Krampfgiftes die Geschwindigkeit seiner Entgiftung beträchtlich intensiviert.

Die Desäthylierung von Nicotinsäuremonoäthylamid

Bei allen unseren Versuchen, ob mit oder ohne Vorbehandlung, konnten wir etwa gleiche Mengen von NSÄA und AcA isolieren. Das spricht dafür, daß die N-Desalkylierung des Nik zu NSÄA im Vergleich zu der ihr folgenden Abspaltung des zweiten Äthylrestes verhältnismäßig schnell verläuft. Es ist wahrscheinlich, daß auch das NSÄA N-desalkyliert wird, und zwar zu NSA. Während aber beim Dimethylaminoantipyrin die erste Methylgruppe bedeutend langsamer abgespalten wird als die zweite (52), scheint im Gegensatz dazu beim Nik die zweite Methylgruppe schwerer abspaltbar zu sein als die erste. Um das zu belegen, boten wir in einigen Versuchen den Lebermikrosomen NSÄA an Stelle von Nik als Substrat an und bestimmten die Menge des freigesetzten AcA. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 4 zusammengefaßt:

	µMol NSÄA eingesetzt	µMol AcA entstanden (korrigiert für Verlust von 30%)	AcA in % der eingesetzten NSÄA-Menge
1	29,58	0 878	2,97
2	29,58	0,542	1,83
3	29,58	0,671	2,26
4	29,58	0,248	0,84
5	29,58	0,404	1,37

Tabelle 4: 1 bis 3 mit α-HCH vorbehandelte Tiere
4 und 5 Kontrolltiere.

Ein Vergleich der Ergebnisse der Tabellen 3 und 4 zeigt, daß die Menge des aus NSÄA entstandenen AcA im gleichen Zeitraum um etwa 60 % geringer ist als in den Versuchen, in denen wir Nik mit Lebermikrosomen inkubierten. Aus Tabelle 4 geht weiter hervor, daß nach Vorbehandlung mit α-HCH unter sonst gleichen Bedingungen etwa doppelt soviel AcA aus NSÄA gebildet wird wie ohne Vorbehandlung.

Wir bemühten uns weiter, in einer Reihe von Versuchen die Menge des nicht verstoffwechselten Nik zu bestimmen, um auch an Hand der Abbauraten des eingesetzten Nik den Aktivierungseffekt der HCH zu zeigen. Da aber die Menge der entstandenen Abbauprodukte im Vergleich zu der Menge des eingesetzten Nik zu gering war, konnten wir hierbei keine brauchbaren Ergebnisse erhalten. Durch diese Versuche ließen sich jedoch andere Abbauwege des Nik ausschließen, da wir nach der Inkubation etwa 75 % nicht verstoffwechseltes Nik isolieren konnten, wobei der Verlust an Nik während der Aufarbeitung des Versuchsansatzes etwa 20 % betrug.

Versuche mit Hirnhomogenaten

Da bei der pharmakologischen Wirkung des Nik der Einfluß auf die Funktion des Zentralnervensystems im Vordergrund steht, haben wir in einigen Versuchen geprüft, ob auch eine aus Hirnhomogenat hergestellte Mikrosomenpräparation Nikethamid zu desäthylieren vermag. Daß Hirngewebe Enzyme besitzt, die Pharmaka chemisch verändern können, ist in einzelnen Fällen nachgewiesen worden, z.B. haben Elison und Elliott (22) gezeigt, daß Morphin durch Hirnschnitte demethyliert wird.

Wir haben unter den gleichen Bedingungen, wie für die Lebern beschrieben, aus den Gehirnen von Ratten verschiedenen Alters (100, 150 und 200 g Körpergewicht) Mikrosomenpräparationen hergestellt und diese mit tritiiertem Nik inkubiert. Wir konnten jedoch niemals, auch nicht mit Hirnmikrosomen HCH-vergifteter Tiere, eine Desäthylierung nachweisen. Die chromatographische Trennung der Pyridinverbindungen auf Kieselgel zeigte nur unverändertes Nik; weder an Hand der UV-Absorption noch mittels der Messung der Radioaktivitätsverteilung waren Metaboliten nachzuweisen. Wir haben nicht näher untersucht, ob unsere Versuchsanordnung optimale Bedingungen

für enzymatische Leistungen isolierter Hirnmikrosomen gewährleistet, und müssen daher die Frage offen lassen, ob Hirngewebe unter anderen Bedingungen Nik in nennenswertem Umfang entgiften kann.

Identifizierung der Bande 3 als Nikethamid-N-oxyd

Wie Abb. 3 (S.19) zeigt, enthielt auch die Bande 3 unserer Chromatogramme Aktivität. Diesen von uns zunächst als Substanz x bezeichneten Stoff fanden wir regelmäßig bei den Aktivierungsversuchen mit α-, ß-HCH und Nik. Bei den Kontrollversuchen war die Substanz chromatographisch nicht sichtbar (Abb.9), und es konnte auch keine Radioaktivität in der Substanz x-Position registriert werden.
Wir hatten zunächst keinen Anhaltspunkt, um was für eine Verbindung es sich bei dieser Substanz handeln könnte. Das UV-Spektrum sprach für eine Verbindung, die kein tertiäres N^1-Atom enthält, da die Form des Spektrums im sauren und alkalischen Milieu identisch war. Wir synthetisierten daher Nik-N-oxyd, NSÄA-N-oxyd, NSA-N-oxyd und das N-oxyd der NS (Beschreibung der Synthese S.5). Die Bestimmung der Rf-Werte dieser Substanzen für Dünnschichtchromatographie in System 2 ergab folgende Werte:

Nik-N-oxyd:	0,47	
NSÄA-N-oxyd:	0,33	
NSA-N-oxyd:	0,14	
NS-N-oxyd:	0	(Die Substanz bleibt am Start liegen).

Diese Werte zeigen, daß sich die einzelnen N-oxyde in System 2 sehr gut voneinander abtrennen. Beim Vergleichen der Rf-Werte dieser N-oxyde mit dem unserer Substanz x ergab sich, daß die Bande 3 und Nik-N-oxyd gleiche Rf-Werte hatten. Wir führten nun weitere vergleichende Untersuchungen durch, um zu entscheiden, ob die Bande 3 mit Nik-N-oxyd identisch ist.

a) Rf-Wert: Nik-N-oxyd und die Substanz x hatten bei der Dünnschichtchromatographie in System 4 gleiche Rf-Werte. Der Rf-Wert betrug 0,37.

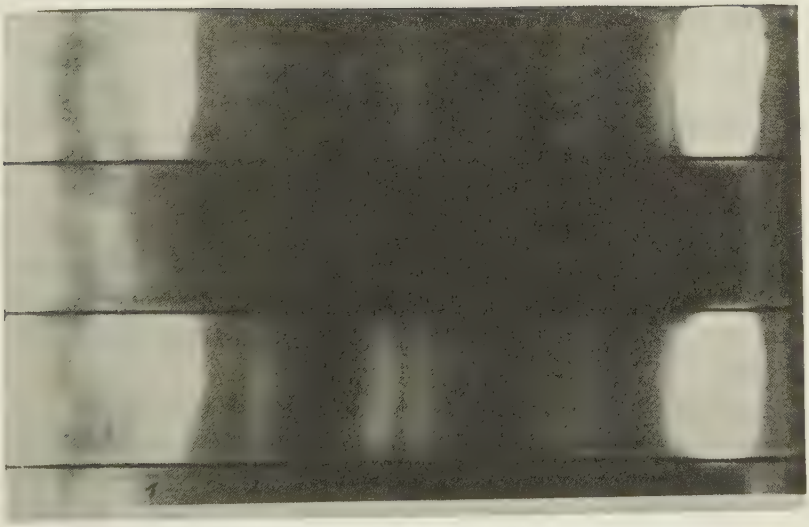


Abb.9: Dünnschichtchromatogramm eines Leberextraktes

oben Kontrolltier
unten nach Vorbehandlung mit α-HCH

1 Nik
2 NSÄA
3 Nik-N-oxyd
4 NSA
5 NS
6 unbekannte Substanz(en) am Start

b) UV-Spektrum: Die auf den Dünnschichtchromatogrammen in der Nik-N-oxyd-Position befindliche Substanz wurde mit $\frac{n}{10}$ HCl eluiert und das Spektrum in $\frac{n}{10}$ HCl und in $\frac{n}{10}$ NaOH geschrieben. Es glich völlig dem Spektrum des von uns synthetisierten Nik-N-oxyd. Die Absorptionskurven zeigt Abb.10.

c) Verteilung: Wir bestimmten die Verteilung von Nik-N-oxyd und unserer Substanz x im System Isobutanol/H_2O bei verschiedenen ph-Werten.

	ph 1	ph 7	ph 14
Nikethamid-N-oxyd	30 : 70	32 : 68	35 : 65
	37 : 63	34 : 66	35 : 65
Substanz x	35 : 65	41 : 59	39 : 61

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, daß der Verteilungskoeffizient von Nik-N-oxyd und der Substanz x in dem System Isobutanol/H_2O bei verschiedenen ph-Werten hinreichend gute Übereinstimmung zeigt.

d) Isotopenverdünnungsanalyse: Um wirklich sicher zu sein, daß die Substanz x und das Nik-N-oxyd identisch sind, führten wir noch eine Isotopenverdünnungsanalyse durch. Da das Nik-N-oxyd extrem hydrophil und an der Luft unbeständig ist, gelang es uns nicht, diese Substanz unter üblichen Versuchsbedingungen zur Kristallisation zu bringen. Wir hydrolysierten daher die Substanz x zu NS-N-oxyd, dessen Kristallisation ohne Schwierigkeiten gelang und mit dem wir die Isotopenverdünnungsanalyse durchführen konnten. Das gewonnene NS-N-oxyd mußte aus Nik-N-oxyd entstanden sein, da die übrigen N-Oxyde bei der Dünnschichtchromatographie in System 2 ganz verschiedene Rf-Werte besitzen und daher vor der Hydrolyse sicher abgetrennt waren.

Im einzelnen führten wir die Isotopenverdünnungsanalyse auf folgende Weise durch:
Das Kieselgel mit der Substanz x wurde von den Dünnschichtplatten abgekratzt, mit Methanol eluiert und die Lösung am Gebläse bis zur Trockene eingeengt. Zu der radioaktiven Substanz wurden 580 mg inaktives Nik-N-oxyd eingewogen und 10 ml 12n HCl hinzupipettiert

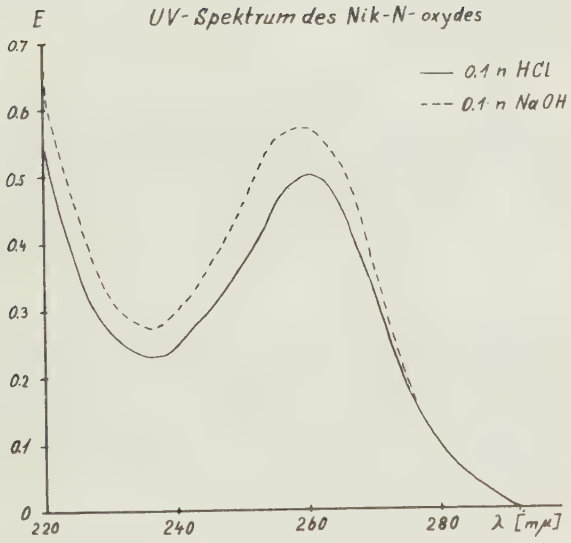


Abb.10: UV-Spektrum von Nikethamid-N-oxyd

Dieser Ansatz wurde in ein Bombenrohr eingeschlossen und vier Stunden in einem Trockenschrank auf 130°C erhitzt. Danach wurde die HCl am Rotationsdampfer abgedampft, der Rückstand zweimal mit Wasser aufgenommen, das Wasser abgedampft und der Rückstand zwölf Stunden in einem Vakuumexsiccator, in dem sich Natriumhydroxyd befand, aufbewahrt. Der Schmelzpunkt der erhaltenen Substanz lag bei 261°C und stimmte mit dem Schmelzpunkt von authentischem NS-N-oxyd überein. Wir lösten die gewonnene Substanz in 10 ml H_2O unter Erwärmen und trugen eine Probe davon auf eine Dünnschichtplatte auf. Als Fließmittel wurde System 4 benutzt. In diesem System beträgt der

Rf-Wert des Nik-N-oxyd 0,85 und

der Rf-Wert des NS-N-oxyd 0,37.

Das angefertigte Dünnschichtchromatogramm zeigte, daß die Hydrolyse vollständig abgelaufen sein mußte, da nur eine in der NS-N-oxyd-Position sich befindende Bande sichtbar war. Zur Umkristallisation benutzten wir eine Lösung von Äthanol in Wasser im Verhältnis 2 : 1. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden jeweils zwischen den Kristallisationen 0,1 ml der Lösung abgenommen und mit $\frac{n}{10}$ HCl auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Es folgte die Zählung der Impulse und die Messung der Extinktion bei = 260 mu. Wir errechneten den Quotienten $\frac{\text{Impulse}}{\text{Extinktionseinheit (EE)}}$ und erhielten dabei folgende Werte:

Kristallisation	Imp./EE
1.	1,495
2.	0,585
3.	0,422
4.	0,287
5.	0,194
6.	0,164
7.	0,178
8.	0,154
9.	0,158
10.	0,129
11.	0,128
12.	0,133
13.	0,129
14.	0,128
15.	0,135
16.	0,128
17.	0,129

Das Ergebnis dieser Isotopenverdünnung besagt, daß der durch hydrolytische Spaltung aus unserer Substanz x entstandene Stoff mit dem NS-N-oxyd identisch sein muß. Da nur das Nik-N-oxyd in System 2 den gleichen Rf-Wert wie die Substanz x hat, alle anderen in Frage kommenden N-Oxyde sich aber in diesem System ganz anders verhalten, so kann man hieraus und aus den anderen beschriebenen vergleichenden Untersuchungen den Schluß ziehen, daß die Substanz x mit dem Nik-N-oxyd identisch ist.

Bande 6

Auffallend war ein Radioaktivitätsausschlag am Start unserer Chromatogramme bei sämtlichen Inkubationsversuchen. Es könnte sich dabei um Nik handeln, das an Eiweiß gebunden ist. Weitere Untersuchungen führten wir hierzu nicht durch.

Die vorangehenden Versuche hatten erwiesen, daß Nikethamid von Leberpräparationen hauptsächlich durch Abspaltung eines Äthylrestes in Monoäthylnicotinsäureamid und z.T. durch N-Oxydation in Nik-N-oxyd umgewandelt wird. Der Ablauf dieser beiden Reaktionen wird offenbar durch Enzyme der Lebermikrosomen katalysiert und ist durch Aktivatoren dieser Enzyme beeinflußbar.

Wir bemühten uns, jetzt zu klären, ob die in vitro gefundenen Stoffwechselprodukte des Nik auch in vivo auftreten. Weiterhin versuchten wir festzustellen, ob eine Aktivierung der Lebermikrosomenenzyme am lebenden Tier ebenfalls zu einem erhöhten Umsatz des Nik führt mit Änderung des Verhältnisses der Metaboliten zueinander.

B Nikethamid-Abbau in vivo

I) Bestimmung der Abbauprodukte des Nikethamid bei unvorbehandelten, mit α-HCH und Nikethamid vorbehandelten Tieren.

Weibliche Ratten wurden mit α-HCH (200 mg/kg) und Nikethamid (200 mg/kg) auf die im Abschnitt Methoden beschriebene Weise vorbehandelt. Nach fünf Tagen wurden diesen Tieren und Kontrolltieren 1,5 bis 2 ml einer ^{3}H-Nik-Lösung mit der spezifischen Aktivität von $4{,}31 \cdot 10^{-6}$ C/µMol bis $7{,}54 \cdot 10^{-6}$ C/µMol i.p. injiziert. Anschließend ließen wir die Tiere vier Stunden in Stoffwechselkäfigen und töteten sie darauf durch Dekapitation. Die einzelnen Organe wurden in Äthanol homogenisiert, das Homogenat im Wasserbad bis zum Sieden erhitzt, und nach dem Absetzen des denaturierten Proteins wurde der Überstand heiß durch ein Filter gegossen. Das Äthanol wurde abdestilliert, der Rückstand in Methanol aufgenommen und aliquote Teile auf Dünnschichtplatten chromatographiert.

Bei der Registrierung der Aktivitätsverteilung auf den Dünnschichtchromatogrammen zeigte sich ein ganz eindeutiger Unterschied zwischen vorbehandelten und Kontrolltieren. Bei den erstgenannten ließ sich eine etwa gleichmäßig über die Chromatogramme verteilte Aktivität erkennen, während sie bei den Kontrolltieren in Höhe der Nik-Position angereichert war.

Im einzelnen fanden sich in den untersuchten Organextrakten folgende Banden auf den Chromatogrammen:

Bande 1: Die Rf-Werte in System 1 und System 2 und das UV-Spektrum (s.Abb.4,S.19a) sprachen dafür, daß es sich bei der Bande 1 um Nikethamid handelt.

Bande 2: Die auf den Chromatogrammen in der NSÄA-Position befindliche Substanz wurde eluiert, durch Ausschütteln in Chloroform gereinigt und das UV-Spektrum in $\frac{n}{10}$ HCl und $\frac{n}{10}$ NaOH geschrieben. Es erwies sich als identisch mit dem NSÄA-Spektrum (s.Abb.7,S.23).

Bande 3: Die Rf-Werte der Bande 3 stimmten in den Systemen 1, 2 und 3 mit den Rf-Werten von Nikethamid-N-Oxyd überein.

Da das Nik-N-oxyd bisher noch nicht gefunden worden war, führten wir eine Isotopenverdünnungsanalyse durch, um einen weiteren Beleg für die Identität der Bande 3 mit dem Nik-N-oxyd zu erhalten. Wir eluierten die Bande 3 von den Dünnschichtplatten mit Methanol und setzten ihr 580 mg inaktives Nik-N-oxyd hinzu. Anschließend wurde der Ansatz zu NS-N-oxyd hydrolysiert (Genaue Beschreibung S.32 und S.34).

Zur Umkristallisation benutzten wir eine Lösung von Äthanol in Wasser im Verhältnis 2 : 1. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden 0,1 ml der gelösten Kristalle abgenommen und mit $\frac{n}{10}$ HCl auf ein definiertes Volumen aufgefüllt. Es folgte die Zählung der Impulse und die Messung der Extinktion bei $\lambda = 260$ mμ. Bei der Berechnung des Quotienten $\frac{\text{Impulse}}{\text{Extinktionseinheit (EE)}}$ erhielten wir folgende Werte:

Kristallisation	Imp/EE
1	3,37
2	3,66
3	1,50
4	0,72
5	0,76
6	0,45
7	0,44
8	0,47
9	0,33
10	0,37
11	0,42
12	0,49
13	0,49
14	0,48
15	0,41

Bande 4: Die Rf-Werte der Bande 4 stimmten in den Systemen 1, 2 und 4 mit den Rf-Werten von NSA überein. In System 4 trennten sich von der in den Systemen 1 und 2 einheitlichen Substanz noch 2 Banden ab. Das Spektrum der in der NSA-Position befindlichen Substanz war mit dem NSA-Spektrum identisch (Abb.11).

Um sicher zu sein, daß NSA tatsächlich als Metabolit des Nik gebildet wird, führten wir noch eine Isotopenverdünnungsanalyse durch. Das Kieselgel wurde mit der Substanz von den Dünnschichtchromatogrammen abgekratzt, die Substanz

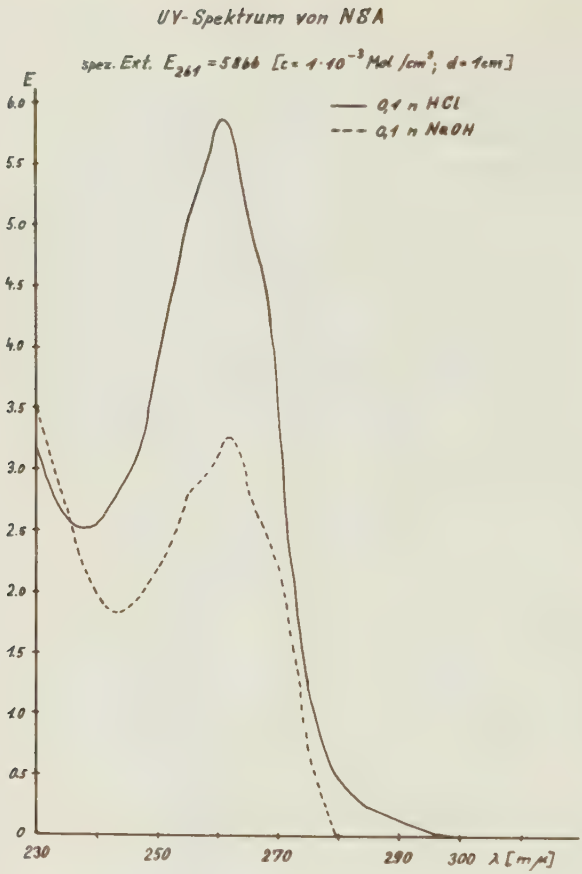


Abb.11: UV-Spektrum von Nicotinsäureamid

mit Methanol eluiert und bis zur Trockene eingeengt. Dieser aktiven Verbindung wurden 50 mg inaktives NSA hinzugefügt. Zur Umkristallisation benutzten wir Benzol. Da Benzol UV-Absorption aufweist, wurde es jeweils nach der Umkristallisation abgedampft; die zurückgebliebenen Kristalle wurden zur Messung der UV-Absorption in $\frac{n}{10}$ HCl aufgenommen. (Ein Leerversuch, bei dem in ein Reagenzglas gegebenes Benzol abgedampft und $\frac{n}{10}$ HCl hinzugegeben wurde, ergab eine Extinktion von 5 bei λ = 261 mμ). Es folgte die Messung der Extinktion bei λ = 261 mμ und die Zählung der Impulse. Wir errechneten den Quotienten $\frac{\text{Impulse}}{\text{Extinktionseinheit (EE)}}$ und erhielten dabei folgende Werte:

Kristallisation	Imp/EE
1	8,45
2	3,58
3	2,85
4	2,25
5	3,05
6	2,96
7	2,92
8	3,40
9	3,86
10	3,51

Das Ergebnis dieser Isotopenverdünnungsanalyse besagt, daß der von uns isolierte Stoff sich nicht von dem zugesetzten NSA abtrennen läßt und somit beide Substanzen identisch sein müssen.

Bande 6 am Start, die ebenfalls Aktivität aufwies, wurde nicht untersucht.

Diese Versuche zeigen, daß in vivo ebenso wie in vitro NSÄA, Nik-N-oxyd und NSA als Stoffwechselprodukte des Nik entstehen. Während NSA aber unter den Versuchsbedingungen in vitro nur in Spuren auftrat, entstand es in den Versuchen in vivo nach Vorbehandlung der Tiere mit α-HCH oder Nik in größeren Mengen.

Aus den Abb.12, 13 und 14 ist die Verteilung der Radioaktivität auf den Dünnschichtchromatogrammen ersichtlich für die

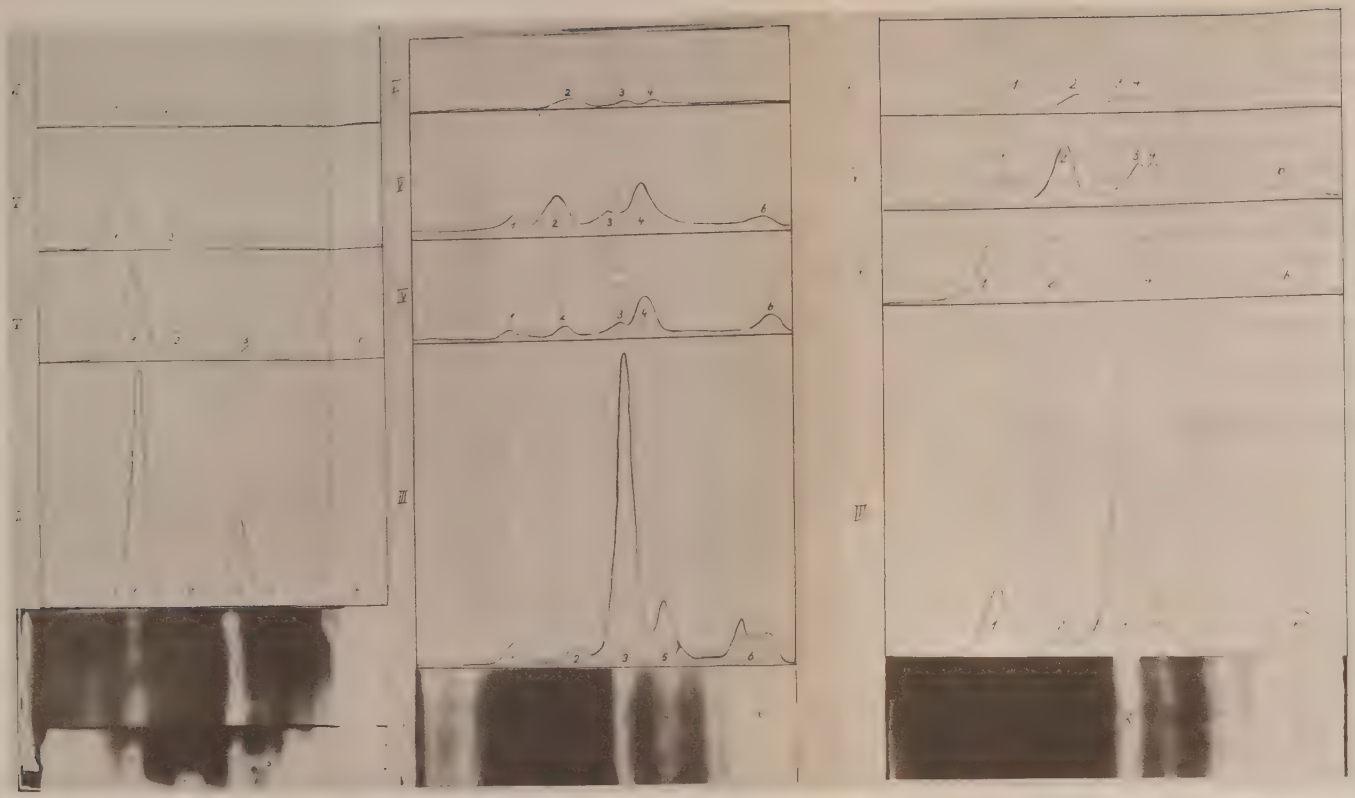


Abb.12,13,14: Urinchromatogramm eines Kontrolltieres (12), eines mit α-HCH (13) und eines mit Nik (14) vorbehandelten Tieres
An das Chromatogramm sind die Registrierkurven des Scanners angelegt, die die Verteilung der Radioaktivität auf dem Urinchromatogramm und den Chromatogrammen mit Extrakten aus Leber, Blut und Gehirn eines Kontrolltieres (12), eines mit α-HCH (13) und eines mit Nik (14) vorbehandelten Tieres zeigen.

I Chromatogramm mit Vergleichssubstanzen
II Urinchromatogramm
III Verteilung der Radioaktivität auf dem Urinchromatogramm
IV Radioaktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm mit Leberextrakt
V " " " " " " Blutextrakt
VI " " " " " " Gehirnextrakt

Die radioaktiven Banden sind mit arabischen Zahlen bezeichnet.
Dabei bedeuten 1 Nik, 2 NSÄA, 3 Nik-N-oxyd, 5 Substanz y, 6 nicht untersuchte Substanz(en) am Start. Zwischen Bande 5 und Bande 6 befinden sich 2 inaktive Banden.
Empfindlichkeit d.Strahlungsmeßger. $2 \cdot 10^3$ Ipm bei Vollausschlag, Dämpfung 20 sec.

VH NCA

Extrakte aus Gehirn, Leber und Blut von unvorbehandelten und vorbehandelten Tieren. Den Registrierkurven wurde ein aus dem entsprechenden Versuch stammendes Urinchromatogramm angelegt, da auf ihm die verschiedenen Substanzen gut zu erkennen waren, während sie in den einzelnen Organextrakten oft in sehr geringer Menge vorhanden und daher nur schwer zu photographieren waren.

Berechnet man die Fläche der peaks und setzt sie in Beziehung zum Frischgewicht des entsprechenden Organs, so ergeben sich die in Tabelle 5 angeführten Werte.

	Nik (cm^2/g)	NSÄA (cm^2/g)	Nik-N-oxyd (cm^2/g)	NSA (cm^2/g)	Start (cm^2/g)
1 Gehirn	0,67	0,30	θ	θ	θ
2 Gehirn	0,14	0,64	0,46	0,36	θ
3 Gehirn	θ	0,64	0,23	0,19	θ
1 Leber	5,95	1,58	0,74	θ	θ
2 Leber	0,82	1,04	0,41	1,03	0,78
3 Leber	0,13	0,34	0,21	1,45	0,84
1 Blut	3,80	1,28	θ	θ	θ
2 Blut	0,52	1,12	0,86	0,91	0,45
3 Blut	0,65	1,25	0,51	1,82	0,34

Tabelle 5: Radioaktivität bezogen auf 1 g Frischgewicht der aus den Organen Gehirn, Leber und Blut gewonnenen Substanzen Nik, NSÄA, Nik-N-oxyd, NSA und einer oder mehrerer nicht identifizierter Verbindungen am Start, ausgedrückt in cm^2Fläche der planimetrierten Radiogramme/g Organgewicht
1 = Kontrolltier θ = unter der Nachweisgrenze
2 = mit Nikethamid vorbehandeltes Tier
3 = mit α-HCH vorbehandeltes Tier.

Die Werte zeigen, daß bei den unvorbehandelten Tieren die Menge des nicht umgesetzten Nik die der einzelnen Metaboliten übertrifft, während bei den vorbehandelten Tieren mehr Stoffwechselprodukte als unverändertes Nik nachzuweisen sind. Als Hauptmeta-

boliten des Nik finden sich bei den vorbehandelten Tieren im Gehirn NSÄA, im BlutNSÄA und NSA, in der Leber NSÄA. NSA war nur in den Organen vorbehandelter Tiere nachweisbar, nicht bei den Kontrolltieren. Nik-N-oxyd fand sich bei den vorbehandelten Tieren in allen drei untersuchten Organen, während es bei dem Kontrolltier nur in der Leber, aber nicht im Gehirn und Blut vorhanden war. Dieses unterschiedliche Verhältnis der Aktivitätsverteilung zwischen Nik und seinen Stoffwechselprodukten bei unvorbehandelten Tieren einerseits und vorbehandelten andererseits stellten wir auch in den übrigen untersuchten Organen fest. Die Abb.15 zeigt dies für die Organe Lunge, Skelettmuskel, Niere und Herz.

Interessant erschien uns ferner die Beobachtung, daß Mageninhalt und Magenschleimhaut relativ große Mengen an Aktivität enthielten, wobei der Hauptanteil trotz Vorbehandlung mit α-HCH auf das Nikethamid entfiel:

	Nikethamid (cm^2/g)	NSÄA (cm^2/g)	Nik-N-oxyd (cm^2/g)	NSA oder Subst.y (cm^2/g)	Start (cm^2/g)
Magenschleimhaut eines mit α-HCH vorbehand.Tieres	4,03	2,86	0,91	0,65	0,33
Mageninhalt eines mit α-HCH vorbehand.Tieres	39,98	21,9	0,975	0,585	0,429
Dünndarminhalt eines mit Nik vorbehand.Tieres	0,63	1,15	0,52	1,68	33,6

Tabelle 6: Radioaktivität bezogen auf 1 g Frischgewicht der aus der Magenschleimhaut, dem Magen- und Dünndarminhalt gewonnenen Substanzen Nik, NSÄA, Nik-N-oxyd, NSA oder Subst. y und einer oder mehrerer nicht identifizierter Verbindungen am Start, ausgedrückt in cm^2 Fläche der planimetrierten Radiogramme/g Organgewicht.

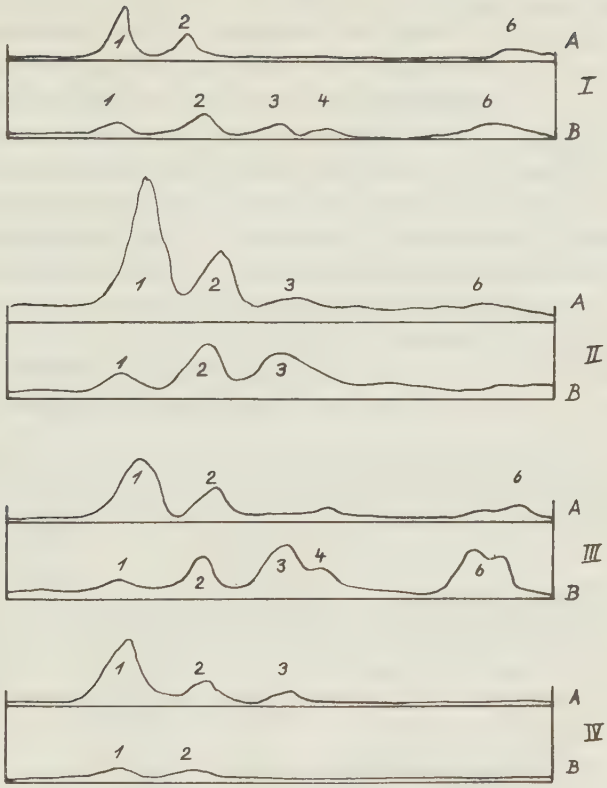


Abb.15: Verteilung der Radioaktivität auf Dünnschichtchromatogrammen für Extrakte aus Herz (I), Skelettmuskel (II), Niere (III) und Lunge (IV).
A = Kontrolltier, B = mit α-HCH vorbehandeltes Tier

1 = Nik
2 = NSÄA
3 = Nik-N-oxyd
4 = NSA
6 = unbekannte Bande am Start
Fließmittel System 2
Empfindlichkeit des Strahlungsmeßgerätes $2 \cdot 10^3$ Ipm bei Vollausschlag
Dämpfung 20 sec.

Hansson und Schmiterlöw (29) konnten in ihren autoradiographischen Untersuchungen zeigen, daß kurze Zeit (5 min.) nach der i.v.Injektion von ^{14}C Nikotin eine hohe Radioaktivität in der Magenschleimhaut vorhanden ist, die etwas später (nach 15 und 30 min.) auch im Mageninhalt erscheint. Die Anreicherung von Nik in der Magenschleimhaut und im Magenlumen ist verständlich auf Grund des basischen Charakters dieser Substanz. Ionisierte Pharmaka können, da sie hydrophil und gering lipoidlöslich sind, nur schlecht durch die Magenwand permeieren. Diese ist nur für undissoziierte Moleküle gut durchlässig. Daraus folgt, daß die ionisierten Pharmaka sich auf der Seite größerer Dissoziation anreichern. Basen werden aus dem Blut über die Magenschleimhaut in den Magen ausgeschieden, Säuren reichern sich aus dem Magenlumen in der Magenschleimhaut an und werden aus dem Blut in den alkalischen Dickdarminhalt ausgeschieden (63).

Auf dem Chromatogramm mit Dünndarminhalt beobachteten wir nach Vorbehandlung mit Nik eine auffällig hohe Aktivität am Start. Wir untersuchten nicht, um welche Substanzen es sich dabei handeln könnte.

Die Beeinflußbarkeit des Nik-Stoffwechsels durch Vorbehandlung mit α-HCH und Nik ließ sich auch durch Untersuchung von Urin und Stuhl nachweisen. Die nach einer halben Stunde ausgeschiedene Aktivität betrug in Prozent der applizierten Aktivität

im Urin	bei Kontrolltier		6,5	
	mit Nik vorbehandeltes Tier		30,3	
	mit α-HCH " "		33,3	
im Stuhl	bei Kontrolltier	Dünndarminhalt)		2,2
		Dickdarminhalt)		
	mit Nik vorbeh.Tier	Mageninhalt		6,06
		Dünndarminhalt	5,23)	6,25
		Dickdarminhalt	1,02)	
	mit α-HCH vorbeh.Tier	Mageninhalt		13,6
		Dünndarminhalt)	4,14)	5,81
		Dickdarminhalt)	1,67)	

Aus diesen Werten ist ersichtlich, daß mit Urin und Stuhl bei vorbehandelten Tieren mehr radioaktive Substanzen ausgeschieden werden als bei unvorbehandelten.

Die Radioaktivitätsverteilung im Urin zeigten bereits die Abb.12,13,14 (S.40). Hier ist der Unterschied zwischen unvorbehandelten und vorbehandelten Tieren besonders deutlich: auf Abb.12 der starke Radioaktivitätsausschlag in Höhe der Bande 1, auf Abb.13 und 14 der höchste peak in Höhe der Bande 3.

Mit Hilfe der UV-Spektren und des Rf-Wertes in System 2 konnten wir die Bande 1 als Nik und die Bande 2 als NSÄA identifizieren. Beim Ausschütteln in Chloroform erwies sich die Bande 3 in der Nik-N-oxyd-Position als nicht einheitlich. Ein Anteil ließ sich mit Chloroform ausschütteln, der andere hingegen nicht. Beide enthielten aber Radioaktivität; sie sind also Stoffwechselprodukte des Nik. Die Substanz, die sich im alkalischen Milieu nicht mit Chloroform ausschütteln ließ, wurde von uns nicht näher untersucht. Ihr Spektrum zeigt Abb.16.

Die andere Substanz, die sich mit Chloroform ausschütteln ließ, hat das gleiche Spektrum wie das von uns synthetisierte N-Oxyd des Nik. Auch die Rf-Werte in System 2 stimmten überein. Um sicher zu sein, daß es sich wirklich um das Nik-N-oxyd handelte, führten wir noch die Isotopenverdünnungsanalyse durch (Beschreibung s.S.32)). Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten (Imp/EE) ergab folgende Werte:

2,32
2,09
2,16
2,30
2,33
2,30
2,30
2,26
2,20

Dieses Ergebnis der Isotopenverdünnung besagt, daß sich, wie auch zu erwarten war, in der für Nik-N-oxyd typischen Position auf unseren Dünnschichtchromatogrammen außer einer anderen unbekannten Substanz auch Nik-N-oxyd befinden muß.

Die Bande 5 (Substanz y) wurde von uns nicht identifiziert. Die Substanz hat folgende Eigenschaften: Sie ist nicht mit Chloroform ausschüttelbar, ihr Rf-Wert in System 1 beträgt 0,29; das Spektrum ist aus Abb.17 ersichtlich.

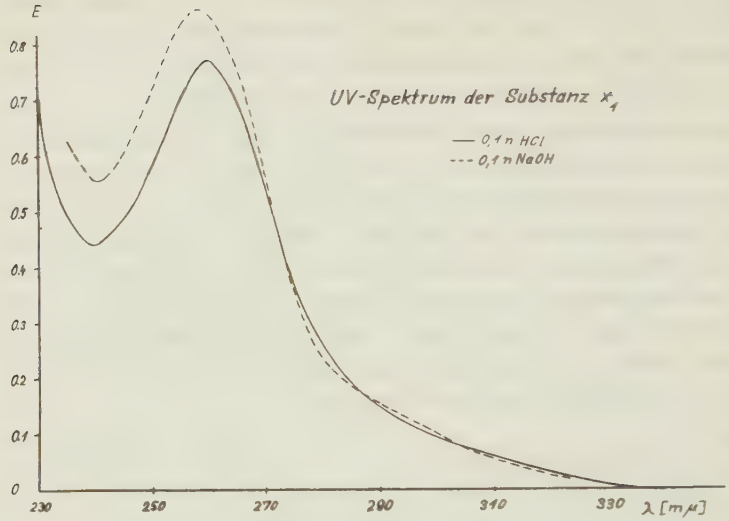


Abb.16: UV-Spektrum einer unbekannten aus dem Urin isolierten Substanz x_1

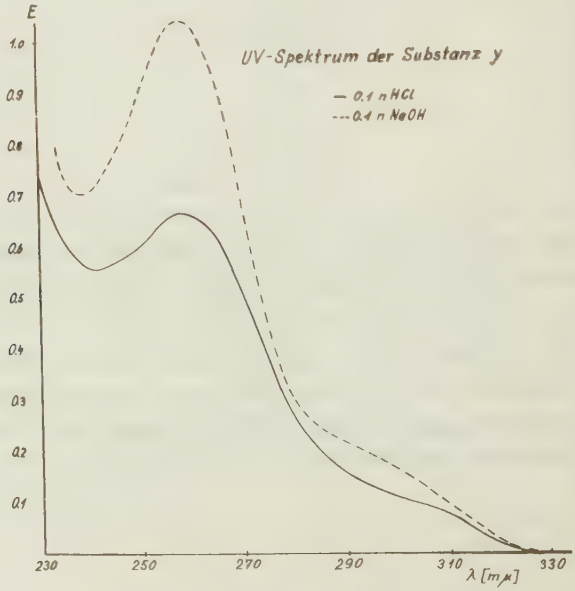


Abb.17:
UV-Spektrum der Substanz y aus dem Urin

Die Bande 4, die wir in den Organextrakten fanden und die mit NSA identisch ist, war auf den Urinchromatogrammen nicht sichtbar. Nachdem Ellinger und Abdel Kader (24) in ihren Versuchen beobachtet hatten, daß nach Verabreichung von Nik im Urin von Ratten vermehrt NSA ausgeschieden wurde, vermuteten wir, daß sich auf unseren Dünnschichtchromatogrammen wegen der großen Zahl von Substanzen im Urin NSA nicht abgetrennt haben könnte. Wir schüttelten daher den Urin mit Chloroform aus und trugen dann die beiden Phasen auf Dünnschichtplatten auf. Bei der Chromatographie in System 2 erhielten wir drei radioaktive Banden aus der wäßrigen Phase und sechs radioaktive Banden aus der organischen Phase. Eine der drei Banden, die aus der wäßrigen Phase isoliert wurden, zeigte in den drei Systemen 1, 2 und 4 die gleichen Rf-Werte wie NSA. Die isolierte Substanz enthielt Radioaktivität und muß daher ein Stoffwechselprodukt des Nik sein. Wir nehmen an, daß es sich um NSA handelt, haben jedoch die Identität nicht weiter geprüft.

II) Bestimmung der Nikethamid-Konzentration in Leber, Blut, Gehirn zum Zeitpunkt des Auftretens von Krämpfen bei unvorbehandelten Tieren und nach Vorbehandlung mit α-HCH

In früheren Versuchen haben Herken und Mitarbeiter (18,37,39) gezeigt, daß durch Nik ausgelöste Krämpfe verhindert werden können, wenn man die Tiere mit HCH-Isomeren vorbehandelt.

Da der Toxizitätsverlust des Mintacol nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit HCH-Isomeren nach Untersuchungen von Vohland (64) seine Ursache in einer beschleunigten Mintacolentgiftung hat, war es naheliegend, anzunehmen, daß auch die Resistenz gegenüber dem Krampfgift Nikethamid durch Beschleunigung des Abbaus dieser Substanz hervorgerufen wird. Um dies zu prüfen, wurde folgender Versuch gemacht:

Vier Ratten wurde eine 2 %ige α-HCH-Lösung (200 mg/kg) i.p. injiziert, vier Vergleichstieren die entsprechende Menge Rapsöl (je 100 g Tier 1 ml). Nach acht Tagen injizierten wir allen acht Tieren eine abgewogene Menge (140 µMol/100 g Tier) ^{3}H-Nik-Lösung und töteten die Tiere eine halbe Stunde später. Die vier mit α-HCH vorbehandelten Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt keine bzw. nur

abgeschwächte Krämpfe, während die vier Vergleichstiere in starken Krämpfen getötet wurden. Die Lebern, das Blut und die Hirne der vier behandelten und der vier Kontrolltiere wurden gesammelt, und ihr Nik-Gehalt wurde mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse bestimmt.

Da uns diese Untersuchung besonders wichtig erscheint, erfolgt hier eine ausführliche Darstellung des Analysenganges. Wir gingen dabei auf folgende Weise vor:

1) Bestimmung der spezifischen Aktivität der verwendeten ^{3}H-Nikethamid-Lösung
2) Bestimmung der applizierten Radioaktivität
3) Nikethamid-Zusatz zur Isotopenverdünnung
4) Messung der Radioaktivität der aus Blut, Gehirn und Leber gewonnenen Extrakte
5) Reinigung der Extrakte und Darstellung des Hydrojodids des quaternären N-Methyl-Nikethamid
6) Umkristallisation und Berechnung des nicht verstoffwechselten Nik pro Gramm Organ.

1) Bestimmung der spezifischen Aktivität der verwendeten ^{3}H-Nikethamid-Lösung

Mit Hilfe von drei verschiedenen Einwaagen, die um 100 mg lagen, berechneten wir die spezifische Extinktion des Nik in $\frac{n}{10}$HCl mit $E_{264} = 5340$ (10^{-3}Mol/cm^{3}; d = 1 cm). Das UV-Spektrum des Nik in $\frac{n}{10}$HCl und $\frac{n}{10}$NaOH zeigte bereits die Abb.4 (S.19).
Durch Dünnschichtchromatographie gereinigtes ^{3}H-Nik wurde mit inaktivem Nik so verdünnt, daß die Lösung 223 µC/g und 92,7 µMol/g enthielt. Daraus errechnete sich eine spezifische Aktivität der applizierten Lösung von 2,41 µC/µMol.

2) Bestimmung der applizierten Radioaktivität

Es wurden pro 100 g Tier je 1,5 ml der ^{3}H-Nik-lösung i.p. injiziert. Die Spritze wurde vor und nach jeder Injektion gewogen, um die genaue Injektionsmenge festzustellen.

Die Kontrolltiere erhielten folgende Mengen Injektionslösung:

Tier Nr.1	2,844 g	Injektionslösung
2	2,184 g	"
3	2,537 g	"
4	2,443 g	"
die 4 Tiere zus.	10,008 g	Injektionslösung

1 g der Injektionslösung enthielt $2,23 \cdot 10^{-4}$C
10,01 g " enthielten $22,32 \cdot 10^{-4}$C

somit erhielten die 4 Kontrolltiere insgesamt 10,01 g Injekt.Lösung
≙ $22,32 \cdot 10^{-4}$C

Summe der Gewichte der 4 Kontrolltiere:

Blut	16,2 g
Leber	26,3 g
Gehirne	6,6 g
restl.Kadaver	628,3 g
	677,4 g

Da das Gewicht der 4 Kontrolltiere nicht gleich dem Gewicht der 4 mit α-HCH vorbehandelten Tiere war, bezogen wir unsere Ergebnisse auf 100 g Tier.

677,4 g Tier erhielten $22,32 \cdot 10^{-4}$C
100 g " erhielten $3,29 \cdot 10^{-4}$C

2,41 µC stammen von 1 µMol
329 µC " " 136,5 µMol

$3,29 \cdot 10^{-4}$C/100 g Tier = 136,5 µMol Nik/100 g Tier

Die mit α-HCH vorbehandelten Tiere erhielten folgende Mengen Injektionslösung:

Tier Nr.5	2,559 g	Injektionslösung
6	2,466 g	"
7	2,380 g	"
8	2,564 g	"
die 4 Tiere zus.	9,969 g	Injektionslösung

1 g der Injektionslösung enthielt $2,23 \cdot 10^{-4}$C
9,97 g " " enthielten $22,23 \cdot 10^{-4}$C

somit erhielten die 4 mit α-HCH vorbehandelten Tiere insgesamt
9,997 g Injektionslösung ≙ $22,23 \cdot 10^{-4}$C

Summe der Gewichte der 4 mit α-HCH vorbehandelten Tiere:

Blut	19,2 g
Leber	35,3 g
Gehirne	7,2 g
restl.Kadaver	587,9 g
	649,6 g

649,6 g Tier erhielten $22,23 \cdot 10^{-4}$C
100 g " " $3,42 \cdot 10^{-4}$C

2,41 µC stammen aus 1 µMol
342 µC " " 141,9 µMol

$3,42 \cdot 10^{-4}$C/100 g Tier = 141,9 µMol Nik/100 g Tier

3) Nikethamid-Zusatz zur Isotopenverdünnung

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und das Blut, die Lebern und Gehirne von den vier mit α-HCH vorbehandelten Tieren und den vier Kontrolltieren getrennt in flüssiger Luft aufgefangen und im erstarrten Zustand pulverisiert. Zu den Organpulvern wurden jeweils 15 ml einer Lösung von Nik in Perchlorsäure pipettiert, die wir uns auf folgende Weise herstellten:

Einwaage von 3 ml = 3,056 inakt.Nik
1n $HClO_4$ ad. 100 ml = 0,171 mMol/cm^3
In 15 ml waren enthalten 0,458 g Nikethamid = 2,57 mMol

4) Bestimmung der Aktivität in den Extrakten

Das in Zentrifugengläsern befindliche Organpulver wurde nach dem Auftauen mit der hinzugegebenen Lösung von Nik in Perchlorsäure zu einem Brei verrührt (Ultra-Turrax), homogenisiert, zentrifugiert (0°C, 45 min., 14000 U/min.) und dekantiert. Der Überstand wurde gesammelt und mit Perchlorsäure zur Messung der Aktivität auf 50 ml (Blut- und Gehirnextrakt) bzw. auf 100 ml (Leberextrakt) aufgefüllt. Die Bestimmung der Radioaktivität der Extrakte ergab folgende Werte:

	Kontrollen	mit α-HCH vorbehandelte Tiere
Leber	$7,3 \cdot 10^{-5}$C	$7,9 \cdot 10^{-5}$C
Blut	$4,5 \cdot 10^{-5}$C	$3,1 \cdot 10^{-5}$C
Gehirn	$1,7 \cdot 10^{-5}$C	$1,1 \cdot 10^{-5}$C

An diese erste Extraktion schlossen wir eine zweite mit 10 ml (für Blut, Gehirn) bzw. 20 ml (für Leber) Perchlorsäure an. Nach dem Homogenisieren, Zentrifugieren und Dekantieren wurde der Überstand wieder gesammelt und auf 25 ml (Blut, Gehirn) bzw. auf 50 ml (Leber) mit Perchlorsäure aufgefüllt. Die Messung der Radioaktivität führte zu folgenden Ergebnissen:

	Kontrollen	mit α-HCH vorbehandelte Tiere
Leber	$1{,}4 \cdot 10^{-5}$C	$0{,}9 \cdot 10^{-5}$C
Blut	$1{,}0 \cdot 10^{-5}$C	$0{,}6 \cdot 10^{-5}$C
Gehirn	$0{,}3 \cdot 10^{-5}$C	$0{,}2 \cdot 10^{-5}$C

Die Summe der bei der 1. und 2. Extraktion errechneten Radioaktivität betrug bei

	den Kontrolltieren	den mit α-HCH vorbeh.Tieren
Leber	$8{,}7 \cdot 10^{-5}$C	$8{,}8 \cdot 10^{-5}$C
Blut	$5{,}5 \cdot 10^{-5}$C	$3{,}7 \cdot 10^{-5}$C
Gehirne	$2{,}0 \cdot 10^{-5}$C	$1{,}3 \cdot 10^{-5}$C

Bezieht man die in den sechs Organextrakten gemessene Radioaktivität auf die Organgewichte, so kommt man zu dem in Tabelle 7 aufgeführten Ergebnis:

	A		B	
	I	II	I	II
Leber	3,89	3,88	3,96	5,43
Blut	2,46	2,39	1,66	2,95
Gehirne	0,89	0,97	1,76	1,11

Tabelle 7: Verteilung der applizierten Radioaktivität auf die einzelnen Organe.

A Kontrolltiere, B mit α-HCH vorbehandelte Tiere

I in den entsprechenden Organextrakten gefundene Radioaktivität in Prozent der applizierten Aktivität

II Organgewicht in Prozent des Körpergewichtes.

Diese Relation Anteil an applizierter Aktivität zu Anteil am Körpergewicht spricht für eine etwa gleichmäßige Verteilung der Substanz im Körper.

5) Reinigung der Extrakte mit Methylenchlorid

Die sauren Eluate wurden mit je 100 cm^3 Methylenchlorid im Scheidetrichter geschüttelt. Bei saurer Reaktion befindet sich das Nik in der wäßrigen Phase. Da beide Phasen stark trübe und verschlammt waren, wurde zweimal zentrifugiert und die wäßrige Phase gesammelt. Nachdem der Überstand $\frac{1}{10}$normal an NaOH gemacht worden war, wurde wiederum mit 100 cm^3 Methylenchlorid im Scheidetrichter ausgeschüttelt und zweimal zentrifugiert. Im alkalischen Milieu befindet sich das Nik im Methylenchlorid. Das Methylenchlorid wurde gesammelt, mit Hilfe von geglühtem Na-Sulfat von dem vorhandenen Wasser befreit und filtriert. Nachdem das Methylenchlorid abdestilliert worden war, wurde zu dem Rückstand Methyljodid im Überschuß hinzugegeben, das 24 Stunden bei Zimmertemperatur einwirkte und Nikethamid in das Hydrojodid des quaternären N-Methylnicotinsäurediäthylamid überführte. Das überschüssige Methyljodid wurde abdestilliert und die zurückbleibenden Kristalle aus Isopropanol umkristallisiert.

6) Umkristallisation

Die Umkristallisationen zur Isotopenverdünnungsanalyse erfolgten jeweils aus Isopropanol. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden stets 0,1 ml der in Isopropanol gelösten Kristalle abgenommen und mit $\frac{n}{10}$HCl auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Es folgte die Zählung der Impulse und die Messung der Extinktion.

Um die molaren Konzentrationen errechnen zu können, bestimmten wir mit Hilfe von drei verschiedenen Einwaagen die spezifische Extinktion vom Hydrojodid des quaternären N-Methyl-Nik in $\frac{n}{10}$HCl mit $E_{266} = 4080$ ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ Mol/cm^3; d = 1 cm).
Der Schmelzpunkt dieser Substanz lag bei 127 bis 128°C und stimmte mit dem von uns hergestellten Hydrojodid des quaternären N-Methyl-Nik überein; das UV-Spektrum zeigt Abb.18.

Abb.18: UV-Spektrum vom Hydrojodid des quaternären N-Methyl-Nikethamid

Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten führte zu folgenden Ergebnissen:

	Kontrollen (µC/µMol)	mit α-HCH vorbehandelte Tiere (µC/µMol)
Leber	$4{,}63 \cdot 10^{-2}$	$3{,}45 \cdot 10^{-2}$
	3,46	3,41
	3,51	3,38
	3,27	3,03
	3,26	3,33
	3,50	3,29
	3,08	3,06
	$3{,}35 \cdot 10^{-2}$ µC/µMol	$3{,}22 \cdot 10^{-2}$ µC/µMol
Blut	$2{,}73 \cdot 10^{-2}$	$2{,}37 \cdot 10^{-2}$
	2,20	2,25
	2,52	2,35
	2,22	1,87
	1,87	1,37
	2,13	1,44
	2,46	1,44
	$2{,}23 \cdot 10^{-2}$ µC/µMol	$1{,}42 \cdot 10^{-2}$ µC/µMol
Gehirn	$8{,}6 \cdot 10^{-3}$	$19{,}4 \cdot 10^{-3}$
	11,4	9,77
	7,76	5,85
	7,98	5,76
	7,97	5,06
	8,53	4,86
	8,21	4,86
	$8{,}09 \cdot 10^{-3}$ µC/µMol	$4{,}93 \cdot 10^{-3}$ µC/µMol

Zur Berechnung der Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten benutzten wir nur diejenigen Einzelwerte, die im Bereich der konstanten spezifischen Aktivität lagen. Sie stehen in der angeführten Aufstellung unterhalb der gestrichelten Linie.

Die Konstanz der spezifischen Aktivität besagt, daß die radioaktive Substanz aus den Extrakten der Leber, des Blutes und des Gehirns mit dem zugesetzten Nik identisch sein muß.
Die Mittelwerte der spezifischen Aktivitäten errechneten wir aus den Werten unterhalb der gestrichelten Linie.
Die Menge an aktivem, nicht verstoffwechseltem Nik pro g Organ

ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$x = \frac{s_b \cdot y}{s_a \cdot g}$$

Dabei bedeuten

x = Menge des gesuchten ^{3}H-Nikethamid

y = Menge des eingesetzten inaktiven Nikethamid

s_a = spezif.Aktivität der appl. ^{3}H-Nikethamid-Lösung

s_b = spezif.Aktivität des Hydrojodid des quaternären N-Methylnicotinsäurediäthylamid

	Kontrolltiere	mit α-HCH vorbeh.Tiere
appliziert	136,5µMol/100 g Tier	141,9 µMol/100 g Tier
Leber		
gefunden:	1,36µMol/g Leber	0,97 µMol/g Leber
in % d.appl.Dosis (100 g Tier)	1,0	0,68
Blut		
gefunden:	1,47µMol/g Blut	0,79 µMol/g Blut
in % d.appl.Dosis (100 g Tier)	1,08	0,56
Gehirne		
gefunden:	1,31µMol/g Gehirn	0,73 µMol/g Gehirn
in % d.appl.Dosis (100 g Tier)	0,96	0,51

Dieser Versuch zeigt, daß die Entgiftung des Nikethamid durch den enzymaktivierenden Effekt des α-HCH so beschleunigt wird, daß in den Organen Leber, Blut und Gehirn von mit α-HCH behandelten Tieren zum Zeitpunkt des Auftretens von Krämpfen nur etwa die Hälfte an Nik vorhanden ist wie bei unvorbehandelten Tieren.

Diskussion

Unseren Untersuchungen entsprechend soll im Folgenden zunächst der Stoffwechsel des Nik diskutiert werden und darauf aufbauend seine Beeinflußbarkeit durch die Isomere des Hexachlorcyclohexan.

In den vergangenen 15 Jahren wurde der Abbau einer großen Anzahl von Arzneimitteln durch Mikrosomen aus Lebern verschiedener Tiere beobachtet (1,2,3,4,5,14,26,43,44,47,51,53,59). Allen diesen Reaktionen ist gemeinsam, daß sie nur bei Anwesenheit von Sauerstoff und TPNH ablaufen. Hierzu gehören folgende Reaktionstypen: die Deaminierung, die N-Desalkylierung, die O-Desalkylierung, die Oxydation von Seitenketten, die Hydroxylierung aromatischer Ringe, die Oxydation von Thioäthern und die N-Oxydation von aliphatischen und aromatischen Aminen (48).

Bei unseren Untersuchungen fanden wir, daß für den Stoffwechsel des Nikethamid der Reaktionstyp der N-Desalkylierung eine entscheidende Rolle spielt. Die N-Desalkylierung wurde bei einer größeren Anzahl von Verbindungen beschrieben, so z.B. bei Morphin, 1-Methadon, Pethidin (4,59), Amidopyrin, Monomethylaminoantipyrin (51), Ephedrin, Methamphetamin (1), 3-Methyl-4-monomethylaminoazobenzol (14), 4-Monomethylaminoazobenzol (44), N-Allylmorphin (5), 3-Hydroxy-N-Methylmorphinan, 3-Methoxy-N-Methylmorphinan (61), bei den N-Methyl-, N-Dimethyl-, N-Äthyl-, N-Diäthyl-, N-Butyl-, N-Dibutylhomologen von 4-Aminoantipyrin (26) und Anilin (26,47).

Als Reaktionsprodukte der N-Desalkylierung wurden das freie Amin und der Alkylrest als Aldehyd nachgewiesen. Eines der bekanntesten Beispiele ist die N-Desalkylierung des Pyramidon (4-Dimethylaminoantipyrin) zu Formaldehyd und 4-Aminoantipyrin. Bei der N-Desalkylierung des Nik konnten wir als Reaktionsprodukte NSÄA, NSA und AcA nachweisen. Die Reaktion wird durch Enzyme, die in der Mikrosomenfraktion enthalten sind, katalysiert. Hierfür spricht, daß die Bildung von AcA aus Nik in Versuchen von Koransky und Portig (50) durch das Phenylessigsäurederivat CFT 1201 gehemmt wurde. Ferner lief die Reaktion auch in gereinigten Mikrosomen ab (unveröffentlichte Versuche von Portig).

Bei Verwendung von Gesamthomogenat verlief die Desalkylierung des Nik schlechter als bei Benutzung eines kern- und mitochondrienfreien Homogenats. Die Metaboliten fielen dabei in so geringer Menge an, daß sie quantitativ nicht mehr bestimmbar waren. Auch Axelrod (4) beobachtete bei Verwendung von Gesamthomogenat nur eine geringere Demethylierung der Narkotika Morphin, Methadon und Meperidin. Er schloß daraus auf die Anwesenheit von Inhibitoren in den Kernen und/oder den Mitochondrien, zumal nach Zusatz von Kernen und Mitochondrien zu Mikrosomen und löslicher Fraktion die Enzymaktivität abnahm.

Wie alle bisher beschriebenen N-Desalkylierungen von Arzneimitteln (4,11,12,14,52,54) findet auch die N-Desalkylierung des Nik wahrscheinlich nur in den Lebermikrosomen statt. Bei Verwendung von Mikrosomen aus dem Gehirn konnten wir keine Abbauprodukte des Nik isolieren. Ebenso waren in Versuchen von Conney, Brown, Miller, Miller (14) und Mueller, Miller (54) Mikrosomen des Gehirns, Herzens, Dünndarms, der Niere, Milz und Lunge nicht in der Lage, N-Alkylamine abzubauen.

Die N-Desalkylierung des Nik verläuft in den Lebermikrosomen nur bei Gegenwart von TPNH und O_2. Bei Verwendung von TPN an Stelle von TPNH gelang es uns nicht, Metaboliten des Nik nachzuweisen (11).

Die Anreicherung von NSÄA in vitro und die Tatsache, daß NSÄA und AcA zu gleichen prozentualen Anteilen aus Nik entstehen, sprechen dafür, daß unter unseren in vitro-Bedingungen im wesentlichen nur eine Äthylgruppe abgespalten wird; das aber würde bedeuten, daß die erste Äthylgruppe des Nik leichter abspaltbar ist als die zweite. Dies konnten wir auch in Versuchen belegen, in denen wir den Lebermikrosomen NSÄA an Stelle von Nik als Substrat anboten. Die Menge des aus NSÄA freigesetzten AcA war um 60 % geringer als in Versuchen, in denen wir Nik mit Lebermikrosomen inkubierten. Während bei der Desalkylierung von Pyramidon (1), 4-Dimethylaminoazobenzol (54) und N,N-Dimethylanilin (47) die erste Alkylgruppe langsamer abgespalten wird als die zweite, liegen die Verhältnisse bei der Verstoffwechselung des Nik genau umgekehrt. Die Desäthylierung des Nik zum NSÄA erfolgt schneller als die Desäthylierung des NSÄA zu NSA.

Unsere Untersuchungen ergaben, daß der Abbau des Nik nicht ausschließlich über eine Desalkylierung verläuft, sondern daß auch eine Oxydation zum N-Oxyd des Nikethamid möglich ist. Bei den in vitro-Versuchen trat das Nik-N-oxyd nur nach Vorbehandlung der Tiere mit HCH-Isomeren und Nik auf, bei den Kontrolltieren war es nicht nachweisbar. Bei unseren in vivo-Versuchen fanden wir zwar auch bei unvorbehandelten Tieren das Nik-N-oxyd, es trat aber im Vergleich zu dem gebildeten NSÄA in den Hintergrund, während bei den vorbehandelten Tieren wiederum das entstandene NSA gegenüber dem Nik-N-oxyd überwog. Der Hauptanteil des Nik scheint also auf dem Wege der N-Desalkylierung abgebaut zu werden, ein geringerer Anteil über die N-Oxydation.

Die enzymatische N-Oxydation wurde u.a. für N,N-Dimethyltryptamin (25), Trimethylamin (6,7), Anilin und N-Alkylaniline (46,47) beschrieben. In Versuchen mit $^{18}O_2$ und mit $H_2{}^{18}O_2$ wiesen Baker und Chaykin (6) nach, daß der Sauerstoff im Trimethylamin-N-oxyd aus molekularem Sauerstoff und nicht aus Wasser stammt. Die N-Oxydation der genannten Verbindungen findet in den Mikrosomen statt. Es ist anzunehmen, daß auch die N-Oxydation des Nik durch Enzyme der Mikrosomenfraktion katalysiert wird. Diese Annahme wird gestützt durch unsere in vitro-Versuche, bei denen wir das Nik-N-oxyd nur nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit HCH-Isomeren nachweisen konnten, jedoch nicht bei unvorbehandelten (S.30).

Die hydrolytische Spaltung des Nik spielt offenbar gegenüber der Desalkylierung und der N-Oxydation eine ganz untergeordnete Rolle. Bei den in vitro-Versuchen gelang es uns zwar, einen Stoff zu isolieren, der sich dünnschichtchromatographisch wie NS verhielt und auch radioaktiv war. Diese Substanz trat aber in so geringen Mengen auf, daß sich kein eindeutiger Identitätsbeweis durchführen ließ. Da ferner in unseren Versuchen die Menge des nicht umgesetzten Nik zusammen mit seinen identifizierten Abbauprodukten der eingesetzten Nik-Menge entsprach, läßt sich daraus schließen, daß die hydrolytische Spaltung des Nik im Vergleich zur Desalkylierung und N-Oxydation dieser Substanz nur eine untergeordnete Rolle spielen kann.

In vivo konnten wir NS als Abbauprodukt des Nik ebenfalls nicht nachweisen.

Wir bemühten uns nicht, sämtliche im Urin vorhandenen Abbauprodukte des Nik zu identifizieren, sondern begnügten uns mit dem Nachweis von unverändertem Nik, NSÄA und Nik-N-oxyd. Daneben werden noch mindestens sechs weitere Metaboliten des Nik mit dem Urin ausgeschieden, wie sich durch Ausschütteln des Urins in Chloroform und anschließende Dünnschichtchromatographie feststellen ließ. Eine dieser Substanzen zeigte in drei verschiedenen Dünnschichtsystemen den gleichen Rf-Wert wie NSA. Es ist wahrscheinlich, daß es sich hierbei um NSA handelt, zumal auch in Versuchen von Ellinger und Abdel Kader (24) nach Verabreichung von Nik im Urin von Ratten vermehrt NSA ausgeschieden wurde.

Ellinger, Coulson (23), Coulson, Stewart (20), Ellinger und Abdel Kader (24) wiesen im Urin von Neugeborenen und im Urin von Ratten N^1-Methyl-Nicotinsäureamid als Stoffwechselprodukt nach. Wir bemühten uns nicht um den Nachweis dieser Substanz. Es ist anzunehmen, daß eine unserer radioaktiven, nicht identifizierten aus dem Urin isolierten Stoffe mit dieser Substanz identisch ist.

Nachdem wir die einzelnen Stoffwechselprodukte des Nik untersucht hatten, interessierten wir uns auch für die pharmakologische Wirkung dieser Substanzen, und zwar besonders deshalb, weil wir hofften, evtl. auf Grund der Eigenschaften dieser Abbauprodukte die etwas uneinheitliche Wirkung des Nik erklären zu können. Während nämlich kleine Dosen Nik praktisch rein erregend wirken, schlägt mit steigender Dosierung diese Erregung allmählich in eine Lähmung um (31,40). Bei kleinen Dosen sind die Reflexe (Progressivreaktionen, tonische Labyrinth- und Halsreflexe auf Extremitäten, Halsstellreflexe und Körperstellreflexe auf den Körper) gesteigert. Bei höheren Dosen treten heftige Krämpfe in Seitenlage auf, wobei der Streckkrampf überwiegt und das Tier in völliger Seitenlage mit Opisthotonus daliegt. Die Körperstellreflexe sind dabei gelähmt; sie kehren nach Abklingen der Krämpfe wieder langsam zurück. Je nach der Höhe der angewandten Dosis erholen sich die Tiere allmählich oder gehen während eines Anfalles in einem maximalen Streckkrampf zu Grunde (40). Nach den bisher

durchgeführten Versuchen kann man von einer besonderen Prädilektionsstelle der Nik-Wirkung im Zentralnervensystem kaum sprechen (40). Nach Beobachtungen von Hahn (28) sind die Nik-Krämpfe supraspinalen, nicht corticalen Ursprungs.

Während bei der Nik-Wirkung die erregende Komponente ganz im Vordergrund steht, soll NSÄA leichte narkotische Wirkung haben (62). In Versuchen von I.Klempau[x] konnten bei Verabreichung von 100 mg NSÄA/kg i.p. an weibliche Ratten keine sichtbaren Erscheinungen registriert werden. Bei Gabe von 500 mg NSÄA/kg i.p. konnten außer einer Steigerung der Atemfrequenz keine weiteren Veränderungen beobachtet werden.

Es ist bekannt, daß aromatische Säureamide fast ausnahmslos narkotisch wirken (30,41,42,49,55). So zeigte auch NSA in Versuchen von Uhlmann (62) eine leichte narkotische Wirkung. Atmung und Kreislauf wurden kaum verändert.

NS ist eine wenig giftige, fast indifferente Substanz. Beim Kaninchen kommt ihr eine schwache sedative bzw. narkotische Wirkung zu (62).

Nach Versuchen von I.Klempau ist das Nik-N-oxyd in dem Dosierungsbereich, in dem Nik die beschriebenen Effekte hervorruft, völlig unwirksam. Die Versuchstiere (weibliche Ratten) verhielten sich nach Dosen von 500 mg/kg s.c., 100 mg/kg i.p., 500 mg/kg i.p., 100 mg/kg i.v. und 200 mg/kg i.v. völlig normal.

Die schwachen pharmakologischen Wirkungen der nachgewiesenen Hauptmetaboliten des Nik lassen den Schluß zu, daß Desalkylierung und N-Oxydation Entgiftungsreaktionen sind, deren Ablaufen die Wirkung des Nik im Organismus beendet.

Im Anschluß an die Diskussion des Nik-Stoffwechsels unter Berücksichtigung der pharmakologischen Wirkung der einzelnen Abbauprodukte soll jetzt auf die Beeinflußbarkeit des Nik-Stoffwechsels durch HCH-Isomeren eingegangen werden.

Zahlreiche Untersuchungen einer Reihe von Autoren haben ergeben, daß Ratten nach einmaliger Vorbehandlung mit HCH-Isomeren gegenüber einer sicher krampfauslösenden Dosis von Cardiazol (32, 33,39), Pikrotoxin (18), Coramin (18,36,37), Strychnin (33,34,35), Prostigmin (36,37), Mintacol (18,56), Scillirosid (64) und

---

[x]Pharm.Inst.d.FU Berlin

Parathion (8) über einen längeren Zeitraum resistent sind. Nachdem wir einige Metaboliten des Nik isoliert hatten, bemühten wir uns, anhand von vergleichenden Versuchen zwischen mit HCH-Isomeren vorbehandelten und unvorbehandelten Tieren aufzuklären, wie es dazu kommt, daß nach Vorbehandlung mit HCH die zu erwartenden Nik-Krämpfe ausbleiben.

Man kann folgende Wirkungsmechanismen der HCH annehmen, die im einzelnen diskutiert werden sollen:

1) eine direkte zentrale Wirkung im Sinne einer Aktivierung von Bremsfunktionen.

2) eine Veränderung der Permeabilität für Nik in Strukturen des Zentralnervensystems.

3) eine Beschleunigung des Nik-Abbaues auf Grund einer Fermentinduktion.

4) eine Beschleunigung des Nik-Abbaues durch Steigerung der Aktivität der vorhandenen Fermente.

ad 1) Herken und Mitarbeiter (18,35,37,38,39) fanden in einer Reihe von Untersuchungen Anhaltspunkte dafür, daß die HCH am Zentralnervensystem angreifen. So zeigten sie in ihren Versuchen (38), daß die HCH auch dann eine Krampfhemmung hervorrufen, wenn Cardiazol intravenös injiziert wird. Da normalerweise zwischen der Injektion einer krampfauslösenden Dosis von Cardiazol und dem Einsetzen der tonisch-klonischen Krämpfe nur eine sehr kurze Zeitspanne besteht, spricht diese Beobachtung der Autoren für einen zentralen Angriffspunkt der HCH. Ferner gelang es Coper, Herken, Rosenkötter und Selbach (19), bei einem mit ß-HCH vorbehandelten Kaninchen nach Injektion von Cardiazol ein typisches Krampf-EEG zu registrieren, während dabei die klinischen Symptome eines Krampfanfalles nicht beobachtet werden konnten.

In Versuchen von Herken, Monnier, Coper und Laue (38) zeigte sich eine deutliche Schutzwirkung der ß-Isomeren gegenüber elektrisch induzierten Krämpfen. Ebenso demonstrierten auch Kewitz und Reinert (45), daß ß-HCH die Elektrokrampfschwelle

bereits 24 Stunden nach der Verabreichung maximal erhöht, während α- und γ-HCH die Elektrokrampfschwelle nicht zu erhöhen vermögen. Herken (38) vermutet auf Grund seiner Versuchsanordnung bei diesem elektrischen Test, daß die ß-Komponente der HCH zu "wesentlichen Änderungen der Reaktionsfähigkeit bestimmter Gebiete des Zwischenhirns (Thalamus) führt". Herken, Monnier, Coper, Laue (38) und Herken, Kewitz, Klempau (37) nehmen auf Grund ihrer Versuche an, daß die Substrate für das Zustandekommen der krampfhindernden Wirkung im supratentorial gelegenen Vorderhirn lokalisiert sind. Es genügte die Abtragung einer Hemisphäre dieses Hirnanteils, um die krampfhindernden Effekte zu beseitigen. Hierbei muß man allerdings bedenken, daß die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Krampfgiften nach operativer Entfernung einer Hemisphäre ansteigt (21). Es wäre deshalb möglich, daß hier trotz der krampfhemmenden Wirkung der HCH Krämpfe auftreten.

ad 2) Mit Hilfe des Autoradiogramms einer Maus (Abb.19) konnten wir zeigen, daß eine halbe Stunde nach i.v.Injektion (Schwanzvene) von ^{3}H-Nik (8 mg ≙ 2,3 µC) eine etwa gleichmäßige Verteilung der radioaktiven Substanz im Organismus erfolgt. Zu dem gleichen Ergebnis führte auch einer unserer in vivo-Versuche (S.46 ff.), bei dem wir die Nik-Konzentration in Leber, Blut und Gehirn zum Zeitpunkt des Auftretens von Krämpfen bei unvorbehandelten Tieren und nach Vorbehandlung mit α-HCH bestimmten. Dabei stellten wir fest, daß nach Vorbehandlung der Tiere mit HCH eine halbe Stunde nach Applikation des Nik die Konzentration dieser Substanz in den genannten drei Organen gleichmäßig um etwa 50 % gegenüber der Nik-Konzentration in den Organen der Kontrolltiere verringert war. Dieses Versuchsergebnis beweist, daß die Wirkung der HCH nicht auf einer Permeabilitätsveränderung an einzelnen Strukturen beruhen kann.

ad 3) und 4)

Es gibt eine Reihe von Anhaltspunkten dafür, daß die HCH Aktivatoren der mikrosomalen Enzyme sind. So beobachteten Herken, Kewitz und Klempau (37), daß die Schlaftiefe der mit α-HCH vorbehandelten Versuchstiere nach Gabe von

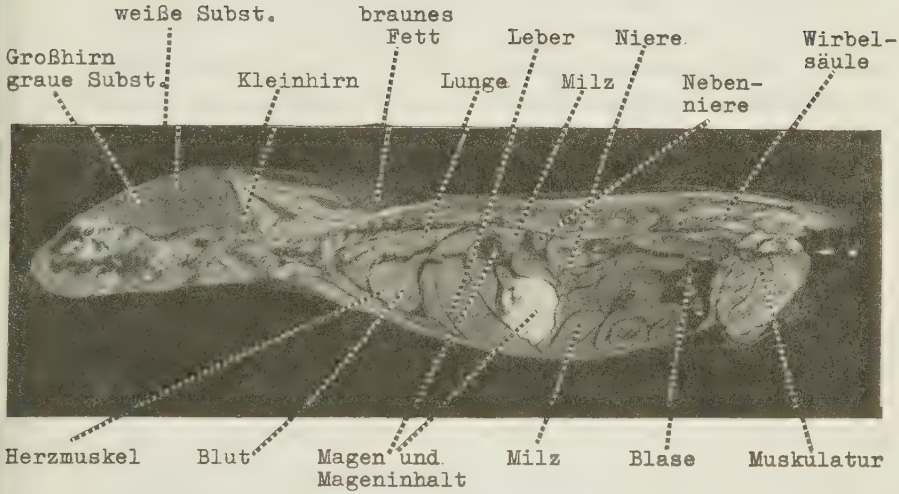


Abb.19: Autoradiogramm einer Maus, die eine halbe Stunde nach i.v.Injektion (Schwanzvene) von ^{3}H-Nik (8 mg ≙ 2,3 µC) in starken Rollkrämpfen getötet wurde. Man erkennt, daß sich die Radioaktivität etwa gleichmäßig im Organismus (Blut, Muskulatur, Knochen, Gehirn, subcutanes Fettgewebe) verteilt. Im Gehirn erscheint das Nik in der grauen Substanz gegenüber der weißen angereichert. Die Anhäufung radioaktiver Substanz in Magenschleimhaut und Magenlumen steht im Einklang mit den auf S.42 beschriebenen Versuchsergebnissen und ist dort erklärt worden.

Diallylbarbitursäure geringer ist als bei unvorbehandelten Kontrolltieren. Die Diallylbarbitursäure wird aber durch Oxydation in den Lebermikrosomen entgiftet (16).
Ferner beobachtete Vohland (64), daß die narkotische Wirkung von Evipan und Eunarkon durch α-, ß- und γ-HCH reduziert wird. Die Bestimmung der Enzymaktivität in vitro bestätigte, daß die Verkürzung der Narkosezeit tatsächlich durch eine beschleunigte Oxydation des Evipan hervorgerufen wird.
Vohland konnte zeigen, daß α-, ß- und γ-HCH die Metabolisierung des Evipan durch Fermente der Lebermikrosomen nahezu verdoppelt.

Vohland (64) studierte auch den Toxizitätsverlust von Scillirosid. Dabei trat eine auffällige Parallelität zwischen dem zeitlichen Verlauf der Krampfhemmung gegenüber Scillirosid und dem Wirkungsverlust des Evipan bei den einzelnen HCH-Isomeren auf.
Es gelang Vohland (64) weiter zu zeigen, daß die HCH den Abbau des Mintacol beschleunigen und dadurch der Wirkungsverlust des Mintacol zustandekommt.

Unsere eigenen Untersuchungen führten uns zu der Überzeugung, daß die Resistenz gegenüber dem Krampfgift Nik nach Vorbehandlung mit HCH-Isomeren auf einer beschleunigten Metabolisierung des Nik beruht. Wir konnten bei den Versuchen in vitro nach Vorbehandlung mit HCH-Isomeren etwa doppelt soviel NSÄA und AcA isolieren wie bei den Kontrolltieren.

Ferner trat bei vorbehandelten Tieren Nik-N-oxyd auf, das wir bei den unvorbehandelten nicht fanden. Auch bei den in vivo-Versuchen war das Verhältnis von Nik zu seinen Stoffwechselprodukten in allen untersuchten Organen bei den aktivierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren deutlich zu Gunsten der einzelnen Metaboliten verschoben. Ebenso betrug die mit dem Urin und Stuhl während einer halben Stunde nach der ^{3}H-Nik-Injektion ausgeschiedene Radioaktivität bei den vorbehandelten Tieren das etwa Fünf- bzw. Dreifache wie bei den Kontrolltieren.

Schließlich zeigte die Bestimmung der Nik-Konzentration in Leber, Blut, Gehirn eine halbe Stunde nach der Injektion von 140 µMol Nik/100 g Tier, daß zu diesem Zeitpunkt in den genannten Organen der vorbehandelten Tiere nur noch etwa die Hälfte des in den Organen der unvorbehandelten Tiere vorhandenen Nik nachgewiesen werden kann. In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, daß die auf S.27 beschriebene Gewöhnung an Nik nicht wie beim Morphium auf einer Verminderung der Empfindlichkeit der Struktur beruht, sondern darauf, daß Nik seinen eigenen Stoffwechsel beschleunigt.

Ob die raschere Metabolisierung des Nik ihre Ursache in einer Fermentinduktion, d.h. in der Synthese neuer Fermente hat oder aber auf einer Aktivierung der vorhandenen Mikrosomenenzyme beruht, können wir anhand unserer durchgeführten Versuche nicht entscheiden.
Ferner können wir auf Grund dieser Versuche auch nicht einen zentralen Angriffspunkt der HCH ausschließen, da wir keine Untersuchungen in dieser Richtung anstellten. Es läßt sich aber wohl sagen, daß der raschere Abbau des Krampfgiftes Nik durch eine Aktivierung der Mikrosomenenzyme nach Vorbehandlung der Versuchstiere mit HCH-Isomeren zur Erklärung des Wirkungsverlustes des Nik ausreicht.

Es wäre interessant festzustellen, ob auch der Wirkungsverlust des Cardiazol nach Vorbehandlung mit HCH-Isomeren auf die gleiche Reaktionsweise zurückzuführen ist. Dazu ist es aber nötig, den Stoffwechsel dieser Substanz zu kennen.

Zusammenfassung

Wir untersuchten den Stoffwechsel des Krampfgiftes Nikethamid in vitro und in vivo und seine Beeinflußbarkeit durch die krampfhemmenden HCH-Isomeren. Dabei wurden folgende chemische Umwandlungen des Nikethamid beobachtet:

1) eine Desalkylierung. Hierbei entstehen als Metaboliten Nicotinsäuremonoäthylamid, Nicotinsäureamid und Acetaldehyd. Da die erste Alkylgruppe des Nikethamid wesentlich schneller abgespalten wird als die zweite, stellt Nicotinsäuremonoäthylamid das Hauptabbauprodukt des Nikethamid dar.

2) eine N-Oxydation. Es entsteht Nikethamid-N-oxyd, eine bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Substanz. Dieser Stoff wurde von uns auch durch Synthese dargestellt und seine Identität mit dem isolierten Produkt bewiesen.

3) eine hydrolytische Spaltung. Diese spielt gegenüber den schon genannten Reaktionen nur eine untergeordnete Rolle.

Die pharmakologische Prüfung der Metaboliten ergab bei den in vivo auftretenden Konzentrationen nur schwache biologische Wirkungen, so daß Desalkylierung, N-Oxydation und hydrolytische Spaltung als Entgiftungsreaktionen betrachtet werden können.

Der Stoffwechsel des Nikethamid läßt sich durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit HCH-Isomeren beeinflussen. Bei Versuchen in vitro erhielten wir nach Vorbehandlung der Tiere mit HCH-Isomeren etwa die doppelte Menge an Stoffwechselprodukten wie bei unvorbehandelten Tieren. Ebenso war bei Versuchen in vivo das Verhältnis von nicht abgebautem Nikethamid zu seinen Metaboliten bei vorbehandelten Tieren gegenüber Kontrolltieren eindeutig zu Gunsten der Metaboliten verschoben.

Eine Bestimmung der Nikethamid-Konzentration in Leber, Blut und Gehirn zum Zeitpunkt des Auftretens von Krämpfen ergab,

daß bei den mit α-HCH vorbehandelten Tieren die Nikethamid-Konzentration in den drei Organen um etwa 50 % verringert war gegenüber der Nikethamid-Konzentration in den entsprechenden Organen der Kontrolltiere.

Diese Ergebnisse lassen eine Deutung der Beobachtung zu, daß Tage nach Verabfolgung von HCH-Isomeren eine sicher krampfauslösende Dosis von Nikethamid bei Ratten keine Krämpfe mehr hervorruft. Der Wirkungsverlust des Krampfgiftes beruht auf seiner durch die HCH-Isomeren induzierten beschleunigten Metabolisierung.

Literaturverzeichnis

1 Axelrod,J.: The enzymatic deamination of amphetamine
J.biol.Chem.214, 735(1955)

2 Axelrod,J.: The enzymatic conversion of codeine to morphine
J.Pharmacol.exp.Ther.115, 259(1955)

3 Axelrod,J.: Enzymatic cleavage of aromatic ethers
Biochem.J.63, 634(1956)

4 Axelrod,J.: The enzymatic N-demethylation of narcotic drugs
J.Pharmacol.exp.Ther.117, 322(1956)

5 Axelrod,J. and Cochin:
The inhibitory action of nalorphine on the enzymatic N-demethylation of narcotic drugs
J.Pharmacol.exp.Ther.121, 107(1957)

6 Baker,J.R. and S.Chaykin:
The biosynthesis of trimethylamine-N-oxide
Biochim.Biophys.Acta 41, 548(1960)

7 Baker,J.R. and S.Chaykin:
The biosynthesis of trimethylamine-N-oxide
J.biol.Chem.237, 1309(1962)

8 Ball,W.L., Sinclair J.W., Crevier N. and K.Kay:
Modification of parathions toxicity for rats by pretreatment with chlorinated hydrocarbon insecticides
Canad.J.Biochem.Physiol.32, 440(1954)

9 Bleuler,E. und M.Bleuler:
Lehrbuch der Psychiatrie, 10.Aufl.1960,335
Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg

10 Brazda,F.G. and R.Baucum:
Hyperfunction in rat liver microsomes by coramine
Fed.Proc.19, 137(1960)

11 Brodie,B.B., J.Axelrod, S.Udenfriend:
Entgiftung von Pharmaka und anderen Fremdverbindungen durch Lebermikrosomen
Science 121, 603/604(1955)

12 Brodie,B.B.: zitiert Gillette
Ann.Rev.Biochem.27, 429(1958)

13 Clemo,G.R. and H.Koenig:
The N-Oxides of Nicotinic Acid and its Esters
J.Chem.Soc.Suppl., 231(1949)

14 Conney,A.H., R.R.Brown, E.C.Miller, J.A.Miller:
The metabolism of methylated aminoazo dyes
VI Intracellular distribution and properties of the demethylase system
Cancer Research 17, 628(1957)

Cooper,J.R. and B.B.Brodie:
Enzyme systems involved in the biotransformation of barbiturates
J.Pharmacol.exp.Ther.110, 12(1954)

6 Cooper,J.R. and B.B.Brodie:
The enzymatic metabolism of hexobarbital (Evipan)
J.Pharm.exptl.Therap.114, 409(1955)

7 Coper,H., Herken,H. und I.Klempau:
Antagonismus und Synergismus des ß- und γ-Hexachlorcyclohexans
Klin.Wschr.1951, 264

18 Coper,H., Herken,H. und I.Klempau:
Wirkungsverlust krampferzeugender Pharmaka durch Hexachlorcyclohexan
Naturwiss.1951, 69

19 Coper,H., Herken,H., L.Rosenkötter und H.Selbach:
Hirnelektrische Untersuchungen nach Einwirkung der krampfhindernden Hexachlorcyclohexane
Klin.Wschr.1952, 551

20 Coulson,P.A. and C.A.Stewart:
Metabolism of Nicotinamide, Nicotinic Acid and Diethylamide of Nicotinic Acid (Coramine) by Newborn and Premature Infants
Proc.of the Society exp.biol.and med.Vol.61(1946)

21 Drake,C.G., Seguin,J.J. and G.W.Stavraki:
The effects of convulsant agents on partially isolated regions of the central nervous system
Canad.J.Biochem.Physiol.34, 689(1956)

22 Elison,C. and H.W.Elliott:
N- and O-demethylation of some narcotic analgetics by brain slices from male and female Long-Evans rats
Biochem.Pharmacol.12, 1363(1963)

23 Ellinger,P. and R.A.Coulson:
The Urinary Elimination of Nicotinamide Methochloride by Man
The Biochem.J.Vol.38, 1(1944)

24 Ellinger,P. and M.M.AbdelKader:
Nicotinamide Metabolism in Mammals
The Biochem.J.Vol.44, 77(1949)

25 Fish,M.S., N.M.Johnson, E.P.Lawrence and E.C.Horning:
Oxidative N-dealkylation
Biochim.Biophys.Acta 18, 564(1955)

26 Gaudette,L.E. and B.B.Brodie:
Relations between lipide solubility of drugs and their oxidation by liver microsomes
Biochem.Pharmacol.2, 89(1959)

27 Gillette,J.R. and J.J.Kamm:
The enzymatic formation of sulfoxides in the oxidation of chlorpromazine and 4,4'-diamino-diphenylsulfide by guinea pig liver microsomes
J.Pharmacol.exp.Ther.130, 262(1960)

28 Hahn,F.: Analeptics
Pharmacol.Reviews Vol.12, 447(1960)

29 Hansson,E. and C.G.Schmiterlöw
Physiological disposition and fate of C^{14}-labelled nicotine in mice and rats
J.Pharmacol.exp.Ther.137, 91(1962)

30 Harras,P.: Arch.internat.de pharmacodyn 11, 431(1903)

31 Hauschild,F. und V.Görisch:
Einführung in die Pharmakologie und Arzneiverordnungslehre
VEB Georg Thieme Verlag Leipzig 293(1964)

32 Herken,H. und I.Klempau:
Zur neurotropen Wirkung einiger Hexachlorcyclohexane
Naturwissenschaften 37, 493(1950)

33 Herken,H.: Zur Wirkung von Hexachlorcyclohexan auf das Nervensystem von Warmblütern
Klin.Wschr.(28) 1950,582

34 Herken,H.: Funktionsstörungen am Nervensystem durch Hexachlorcyclohexan
Arch.exp.Path.u.Pharmakol.212, 158(1950)

35 Herken,H.: Änderung der Zellfunktionen im Nervensystem durch Hexachlorcyclohexan
Arch.exp.Path.u.Pharmakol.211, 143(1950)

36 Herken,H.: Eingriffe am Nervensystem mit Hexachlorcyclohexan
Arzneimittelforschung 1, 356(1951)

37 Herken,H., Kewitz,H. und I.Klempau:
Wirkungsverluste von Krampfgiften durch Hexachlorcyclohexan
Arch.exp.Path.u.Pharmakol.215, 217(1952)

38 Herken,H., Monnier,M., Coper,H. und H.Laue:
Hemmung subcortikal ausgelöster Krampfpotentiale durch ß-Hexachlorcyclohexan
Experientia (Basel) 8, 432(1952)

39 Herken,H.: Allobiotische Wirkungen am Zentralnervensystem
Ärztl.Wschr.(7),1952, 545

40 Hildebrandt-Gießen:
Pyridin-ß-carbonsäurediäthylamid (Coramin)
Handbuch der exper.Pharmakologie
Erg.Bd.V,S.128(1937)

41 Hildebrandt,H.:
Einige Synthesen im Tierkörper
Arch.f.exp.Pathol.u.Pharmakol.44, 278(1900)

42 Hildebrandt,H.:
Über die Wirkungsweise einiger sekundärer Amine der Fettreihe und ihre Beeinflussung durch Einführen von Atomkomplexen der aromatischen und aliphatischen Reihe
Arch.f.exp.Pathol.u.Pharmakol.54, 125(1906)

43 Hodgson,E. and J.E.Casida:
Biological oxidation of N,N-dialkyl carbamates
Biochim.Biophys.Acta 42, 184(1960)

44 Hultin,T.: Reactions of C^{14}-labelled carcinogenic azo dyes with rat liver proteines
Exptl.cell.Res.13, 47(1957)

45 Kewitz,H. und H.Reinert:
Zum Nachweis von Funktionsänderungen im Zentralnervensystem durch elektrisch und chemisch induzierte Krämpfe
Arch.exp.Path.u.Pharmakol.215, 93(1952)

46 Kiese,M. und H.Uehleke:
Zwei Wege der Entmethylierung von N-Methylanilin durch Mikrosomen aus Rattenlebern
Naturwissenschaften 48, 379(1961)

47 Kiese,M. und H.Uehleke:
Der Ort der N-Oxydation des Anilins im höheren Tier
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak.242, 117(1961)

48 Kiese,M.: TPNH-abhängige Fermente in Mikrosomen, die Gifte oxydieren
Gemeins.Tagung d.Deutsch.Ges.f.Physiol.Chemie Wien 1962 - Symposium

49 Kionka,H.: Arch.internat.de pharmacodyn 13, 232(1904)

50 Koransky,W. und J.Portig:
Über den Stoffwechsel des Nikethamids bei der Ratte
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak.246, 64(1963)

51 La Du,B.N., N.Trousof and B.B.Brodie:
Enzymatic dealkylation of aminopyrine and other alkylamines in vitro
Federat.Proceed.12, 339(1953)

52 La Du,B.N., L.Gaudette, N.Trousof and B.B.Brodie:
Enzymatic dealkylation of aminopyrine (pyramidon) and other alkylamines
J.biol.Chem.214, 741(1955)

53 Mitoma,Ch., H.S.Posner, H.C.Reitz, S.Udenfriend:
Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds
Arch.Biochem.61, 431(1956)

54 Mueller,G.C. and J.A.Miller:
The metabolism of methylated aminoazo dyes
II.Oxidative demethylation by rat liver homogenates
J.biol.Chem.202, 579(1953)

55 Nebelthau: Über die Wirkungsweise einiger aromat.Amide und ihre Beeinflussung durch Einführen von Methyl- oder Äthylgruppen
Arch.f.exp.Pathol.u.Pharmakol.36, 451(1895)

56 Neubert,D. und J.Schaefer:
Wirkungsverlust des Diäthyl-p-Nitrophenylphosphats und Oktomethylpyrophosphoramids nach Vorbehandlung mit α-Hexachlorcyclohexan
Arch.exp.Path.u.Pharmakol.233, 151(1958)

57 Remmer,H.: Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermikrosomen unter dem Einfluß von Luminal
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak.235, 279(1958)

58 Riemschneider,R.:
Zur Kenntnis der Kontakt-Insektizide II
Die Pharmazie,9.Beih./I.Erg.bd. 728(1950)

59 Roth,J.S. and J.Bukowsky:
N-demethylating system in rat liver microsomes
J.Pharmacol.exp.Ther.131, 275(1961)

60 Stotz,E.: A colorimetric determination of Acetaldehyde in blood
J.Biolog.Chem.148, 585(1943)

61 Takemori,A.E. and G.J.Mannering:
Metabolic N- and O-demethylation of morphine- and morphinan-type analgetics
J.Pharmacol.exp.Ther.123,171(1958)

62 Uhlmann,Fr.: Über Coramin. Eine neue kampferähnlich wirkende Substanz
Zeitschr.f.d.ges.exper.Medizin 43, 556(1924)

63 Vogt,W.: Resorption von Pharmaka durch Diffusion
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.Pharmak.250, 210(1965)

64 Vohland,H.-W.:
Zum Mechanismus der antikonvulsiven Wirkung der Hexachlorcyclohexane
Inaugural-Diss.am Pharm.Inst.d.FU/Berlin (1964) veröffentlicht in Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak.249, 1(1964); 247, 49(1964); 247, 61 (1964)

Ghazal,A., W.Koransky, J.Portig, H.-W.Vohland u.I.Klempau:
Beschleunigung von Entgiftungsreaktionen durch verschiedene Insecticide
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.u.Pharmak.249, 1-10(1964)

Koransky,W., J.Portig, H.-W.Vohland und I.Klempau:
Die Elimination von α- und γ-Hexachlorcyclohexan und ihre Beeinflussung durch Enzyme der Lebermikrosomen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp.Path.u.Pharmak.247, 49(1964)

Koransky,W., J.Portig, H.-W.Vohland und I.Klempau:
Aktivierung von Mikrosomenenzymen durch Hexachlorcyclohexan-Isomere.Ihr Einfluß auf die Scillirosidvergiftung der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp.Path.u.Pharmak.247, 61-70(1964)

Herr Direktor Professor Dr.med.Herken gab mir die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten. Dafür danke ich ihm.

Herrn Professor Dr.med.Koransky und Herrn Dr.med.Portig bin ich für das Interesse und die Unterstützung, die sie meiner Arbeit zuteil werden ließen, zu Dank verpflichtet.

Für technische Hilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich Fräulein Noack.

Lebenslauf

Am 27. Januar 1941 wurde ich als Tochter des Dr.-Ing. Fritz Roedler, jetzt Direktor und Professor beim Bundesgesundheitsamt, und seiner Ehefrau Liselotte, geb. Holtzmann, in Berlin geboren.

Von 1947 bis 1953 besuchte ich die Grundschule in Borgsdorf bei Oranienburg und in Berlin-Zehlendorf, daran anschließend den altsprachlichen Zug des Arndt-Gymnasiums in Berlin-Dahlem. Dort machte ich im März 1960 das Abitur unter Befreiung von der mündlichen Prüfung.

Im Frühjahr 1960 schrieb ich mich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin ein, wo ich nach zwei Semestern die naturwissenschaftliche Vorprüfung mit "sehr gut" und nach weiteren drei Semestern die ärztliche Vorprüfung ebenfalls mit "sehr gut" bestand. Anschließend studierte ich drei Semester an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg i.Br. Zum Sommersemester 1964 kehrte ich an die Freie Universität Berlin zurück und legte hier am 19. Oktober 1966 das medizinische Staatsexamen mit "sehr gut" ab.

Im März 1964 begann ich im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Professor Dr.med. Koransky und Herrn Dr.med. Portig mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.